

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1938-1939.

Série E, N° 3.

Contribution à l'étude du microdosage
du brome en vue d'applications biologiques

THÈSE

pour l'obtention du

Diplôme supérieur de Pharmacien

Présentée et soutenue le mars 1939

PAR

PAUL BALATRE

PHARMACIEN,

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES,

CHEF DE TRAVAUX A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE.

JURY { MM. A. DAMIENS, *Président*,
H. HÉRISSEY, *Professeur*,
P. FLEURY, *Maître de Conférences*.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

—
1939

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1938-1939.

Série E, N° 3.

Contribution à l'étude du microdosage
du brome en vue d'applications biologiques

THÈSE

pour l'obtention du

Diplôme supérieur de Pharmacien

Présentée et soutenue le mars 1939

PAR

PAUL BALATRE

PHARMACIEN,

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES,

CHEF DE TRAVAUX A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE.

JURY { MM. A. DAMIENS, *Président*,
H. HÉRISSEY, *Professeur*,
P. FLEURY, *Maître de Conférences*.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1939

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. A. DAMIENS, Doyen, O. *, I.
 P. LEBEAU, Assesseur, O. *, I., Membre de l'Institut.
 H. J. LIONNET Secrétaire, I.

PROFESSEURS

MM. LEBEAU, O. *, I., Membre
 de l'Institut..... Pharmacie chimique.
 GORIS, O. *, I..... Pharmacie galénique.
 DAMIENS, O. *, I..... Chimie minérale.
 HÉRISSEY, O. *, I..... Chimie biologique.
 SOMMELET, *, I..... Chimie organique.
 LUTZ, *, I..... Cryptogamie et Micro-
 biologie.
 FABRE, *, I..... Toxicologie.
 LAUNOY, O. *, I..... Zoologie.
 DELABY, *, I..... Chimie analytique.
 PICON, *, I..... Physique.
 MASCRÉ, I..... Histoire naturelle des médicaments simples
 d'origine végétale.
 BACH, *, I..... Botanique générale.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. *, I. — GUÉRIN, O. *, I.

Professeurs honoraires :

MM. BÉHAL, G. O. *, I. et DELÉPINE, O. *, I., membres de l'Institut,
 PERROT, C. *, I., COUTIÈRE, O. *, I., BOUGAULT, O. *, I.,
 et TASSILLY, O. *, I.

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

MM. FLEURY, I..... Hydrologie et Hygiène.
 BEDEL, I..... Minéralogie, Législation et Déontologie pharmaceutiques.
 RÉGNIER, I..... Parasitologie.
 CHARONNAT, I..... Chimie et Pharmacie Chimique.
 JANOT..... Pharmacie galénique et biologie
 végétale.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE... Travaux Pratiques de 1^{re} année. Chimie générale et
 pharmaceutique.
 GAUTHIER, A. — de 2^e et 3^e année. Chimie analytique.
 PARIS..... Micrographie.
 CORRIEZ..... Physique.
 VALETTE, A..... Microbiologie.
 GUILLOT. . . Travaux pratiques de 4^e année. Chimie biologique, Bromato-
 logie et Pharmacie chi-
 mique.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, A.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. DAMIENS

DOYEN DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Respectueux Hommage.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR H. HÉRISSEY

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Hommage de respectueuse gratitude.

A MON MAÎTRE :

MONSIEUR P. FLEURY

MAÎTRE DE CONFÉRENCES

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

PHARMACIEN-CHEF

DES HÔPITAUX PSYCHIATRIQUES DE LA SEINE

*En témoignage de profonde
reconnaissance et de res-
pectueux attachement.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR F. MORVILLEZ

PROFESSEUR DE PHARMACIE GALÉNIQUE

ET DE BOTANIQUE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LILLE

Avec toute ma reconnaissance.

A MON MAÎTRE DE STAGE :

MONSIEUR L. PÉCHON

DOCTEUR EN PHARMACIE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

*Avec mes sentiments affectueux
et reconnaissants.*

INTRODUCTION.

BALARD, qui découvrit le brome en 1826, posa en même temps le problème biologique de cet élément. Dans son mémoire originel [1], on trouve en effet au cours d'un chapitre intitulé : « de l'histoire naturelle du brome », les quelques phrases suivantes :

« Le brome se trouve dans l'eau de la mer dans des proportions très faibles... Les végétaux et les animaux qui vivent dans la mer contiennent encore du brome.

Les cendres des plantes qui croissent dans la Méditerranée donnent toutes une teinte jaune quand on traite par le chlore le produit de leur lixiviation. J'ai encore vu se produire la même teinte en traitant par cet agent la solution des cendres du *Ianthina violacea*, mollusque testacé....

« J'ai pu retirer des quantités notables de brome des eaux-mères de la soude varech qui servent à l'extraction de l'iode...

« Tout cela rend très probable qu'on retrouvera le brome dans un grand nombre de productions marines ou d'origine sous-marine ».

Quelques auteurs ont par la suite signalé le brome dans divers produits biologiques. Mais ce n'est qu'en 1912 que LABAT [2], dans un travail d'ensemble très étendu, reprit la question et, à l'aide d'une technique spécifique, trouva du brome d'une façon certaine dans un certain nombre des organes qu'il examina.

En 1920 A. DAMIENS [3], à l'aide d'une méthode mise au point par lui, réussit à doser d'une façon sûre le brome, qu'il retrouva dans tous les organes animaux examinés.

Si la présence constante de cet halogène dans les organismes vivants pouvait être admise à la suite des travaux de A. DAMIENS, la signification physiologique de cet élément restait un problème entier.

Ce n'est qu'en 1931-1932 que ZONDEK et BIER [4] ont obtenu des résultats qui, s'ils avaient été confirmés, auraient été du plus haut intérêt pour l'étude du problème de la pathogénie de la psychose maniaque dépressive et du mécanisme du sommeil. Selon ces auteurs, le sang contiendrait environ 1 mg. p. 100 de brome. Chez de nombreux individus normaux et chez quelques autres, atteints de différentes maladies, on aurait toujours trouvé des valeurs approximatives du pourcentage indiqué ; dans la psychose maniaco-dépressive, le brome du sang serait considérablement diminué. Sans affirmer que cette diminution serait la cause primordiale de cette maladie, on la considérerait toutefois, comme spécifique de la psychose maniaco dépressive.

Les mêmes auteurs, en se servant toujours dans leurs déterminations de la microméthode de PINCUSSEN et ROMAN, ont encore étudié la richesse des différents organes en brome. Ils auraient constaté, par exemple, que le lobe antérieur de l'hypophyse et que sa *pars intermedia* en contenaient de 15 à 30 mg. p. 100 ; tandis que le cerveau n'en contiendrait que 0,15-0,18 mg. p. 100. Seul le diencéphale en contiendrait un pourcentage élevé (1,5-1,8 mg.). Enfin en provoquant chez le chien un sommeil artificiel par l'administration d'un somnifère et en sacrifiant quelques uns de ces animaux pendant le sommeil et d'autres à

l'état de veille, ils auraient constaté que, chez les animaux endormis, le brome de l'hypophyse baissait de 15-30 mg. à 5-7 mg. p. 100, tandis que dans le bulbe il passait de 0,38-0,41 mg. p. 100 à 0,61 ou 0,64 p. 100. ZONDEK et BIER auraient encore isolé une hormone du lobe antérieur de l'hypophyse, (la bromhormone) à laquelle ils attribuaient, de même qu'aux modifications quantitatives du brome dans les organes mentionnés, un rôle important dans le mécanisme du sommeil. Ils appelaient ainsi l'attention sur le rôle des mécanismes hormonaux dépendant de l'hypophyse dans le rythme du sommeil normal.

Il est inutile de souligner l'importance que présenteraient de telles constatations si elles avaient pu être confirmées. Il en est résulté que les affirmations de ZONDEK et BIER ont amené de nombreux chimistes, physiologistes, médecins à s'occuper de la question du dosage du brome.

Malheureusement la méthode de PINCUSSEN et ROMAN, utilisée par ZONDEK et BIER, a été démontrée inexacte en particulier par A. DIAS [4 bis], dans le laboratoire duquel ROMAN lui-même dut reconnaître l'incertitude de sa méthode.

A la demande de M. Paul ABELY, Médecin-Chef des Hôpitaux psychiatriques de la Seine, que le côté psychiatrique de la question intéressait, nous avons été ainsi amené à nous occuper du dosage du brome dans l'organisme.

Ce sont les résultats de ces recherches qui sont exposés dans ce travail. Nous nous sommes proposé pour but la mise au point d'une méthode qui fut à la fois *rapide* pour permettre facilement des dosages en série, *simple* pour ne pas nécessiter l'emploi d'appareils compliqués et coûteux, *sensible* pour permettre d'opérer sur de petites prises d'essai et enfin *suffisamment exacte* pour le but poursuivi. Nous avons

donc été amené à examiner différentes méthodes ; plusieurs de celles-ci, excellentes en elles-mêmes, ne répondaient cependant pas au but que nous désirions atteindre. Sans prétendre vouloir innover, nous avons été amené à modifier ces méthodes et nous sommes ainsi arrivés à mettre au point une technique qui répondait aux desiderata que nous exposons ci-dessus. Ces recherches analytiques constituent les deux premières parties de notre travail : dans la première nous étudierons le problème du microdosage du brome minéralisé ; dans la deuxième partie, nous exposerons les différentes méthodes de minéralisation.

Enfin dans une troisième partie, nous donnerons quelques applications de notre technique.

Voici donc le plan que nous suivrons pour cette étude :

Première partie.

DOSAGE DU BROME MINÉRALISÉ.

Chapitre I. — Les méthodes à la fuchsine.

Chapitre II. — Les méthodes à la fluorescéine.

Chapitre III. — Les méthodes à la phénolsulfonaphthaléine.

Deuxième partie.

MINÉRALISATION.

Chapitre I. — La méthode de Th. LEIPERT et O. WATZLAWEK.

Chapitre II. — La méthode de A. DAMIENS.

Chapitre III. — Technique personnelle.

Troisième partie.

APPLICATIONS.

CONCLUSIONS.

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, nous avons un agréable devoir à remplir : c'est d'exprimer notre respectueuse gratitude à M. le Professeur A. DAMIENS, dont les conseils nous furent si précieux et qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous tenons à témoigner notre respectueuse reconnaissance à M. le Professeur H. HÉRISSEY pour le bienveillant accueil qu'il nous a toujours réservé et pour tout l'intérêt qu'il n'a cessé de nous porter.

Nous sommes très heureux de pouvoir remercier M. P. FLEURY, Maître de Conférences, qui, avec son dévouement inlassable, nous a initié à la recherche scientifique. Pendant les années fructueuses que nous avons passées dans son laboratoire, il n'a cessé de nous faire profiter de sa grande expérience et nous a donné les marques de la plus bienveillante affection.

Cette publication est, pour nous, une occasion précieuse de témoigner à notre Maître notre très vive reconnaissance et notre très profond attachement.

M. le Professeur F. MORVILLEZ nous a fait le grand honneur de nous confier la direction des travaux pratiques de pharmacie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Lille. Nous lui exprimons notre vive gratitude et notre respectueuse reconnaissance.

Nos sentiments de vive gratitude iront aussi à notre Maître de stage, M. L. PECHON, docteur en pharma-

cie, qui nous initia à la pratique pharmaceutique et qui restera toujours pour nous le plus vivant exemple de conscience professionnelle. Que celui dont nous nous honorons d'être l'ami, trouve ici l'expression de nos sentiments affectueux et reconnaissants.

Nous ne saurons oublier nos Maîtres de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie d'Amiens et tout particulièrement M. le Directeur honoraire PANCIER, dont nous eumes l'honneur d'être le préparateur, M. le Professeur BOUCHEZ, dont nous fumes par la suite le collaborateur et MM. les Professeurs HANOT et PAUCHET.

Nous adressons à MM. les docteurs X et P. ABELY, médecins-chefs des hôpitaux psychiâtriques de la Seine, l'expression de nos sentiments très reconnaissants pour l'intérêt qu'ils nous ont toujours témoigné.

PREMIÈRE PARTIE.

DOSAGE DU BROME MINÉRALISÉ.

De nombreux procédés permettent le dosage du brome en présence de chlore. Mais si on envisage le problème du point de vue biologique, la chimie analytique doit fournir un procédé qui soit applicable dans des cas extrêmement défavorables : le rapport $\frac{\text{Br—}}{\text{Cl—}}$ y est en effet de l'ordre de 1/1000 et on ne dispose souvent que de quantités très limitées de produits à examiner. Il faut donc un procédé capable de doser quelques γ de brome en présence de grandes quantités de chlore.

Dans une étude très détaillée, S. GILDE [5] a montré qu'il était impossible de résoudre ce problème par les méthodes de dosage par pesée ou de dosage volumétrique par précipitation et encore moins par dosage indirect. Cet auteur a essayé d'appliquer la méthode polarographique de HEYROVSKY aux dosages des anions et notamment au dosage du brome en présence de chlore ; il a réussi à mettre au point un procédé d'analyse potentiométrique, qui permet de déterminer en quelques minutes la teneur en bromure dans des solutions de chlorure. Pour des concentra-

tions en brome supérieures à 0,2 p. 100 l'erreur relative ne dépasserait pas 10 p. 100 ; par contre pour des concentrations plus petites, l'erreur peut atteindre 40 p. 100. Enfin cette méthode ne paraît pas pouvoir doser des quantités de brome, suffisamment petites pour être employées en vue du problème qui nous intéresse.

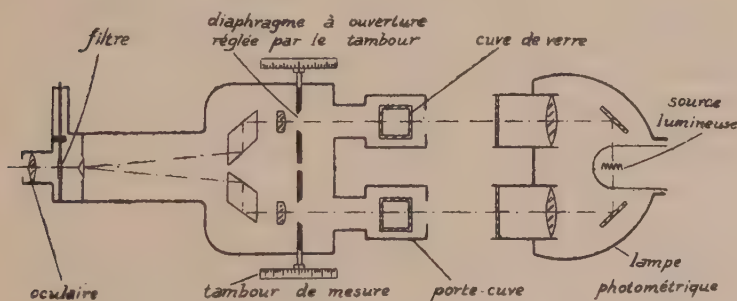
Les *méthodes volumétriques*, consistant à libérer le brome d'une solution de bromure par des oxydants et titrant ensuite ce brome par déplacement de l'iode, ont été employées par de nombreux auteurs. Ces méthodes ont notamment été passées en revue et critiquées dans les articles récents de Ch. O. GUILLAUMIN et B. MEREJKOWSKI [6] et de Mlle L. OLSZICKA [7]. Nous ne retiendrons parmi les méthodes volumétriques que celle qui consiste à transformer le brome en bromate ; celui-ci, agissant sur une solution d'iodure de potassium, libère l'iode que l'on titre par l'hyposulfite. Cette technique a été bien étudiée par VAN DER MEULEN [8] et appliquée par Th. LEIPERT et O. WATZLAVEK [9] : nous l'étudierons en même temps que la méthode générale de ces deux derniers auteurs (voir page 71).

Les *méthodes colorimétriques* sont celles qui ont été les plus employées : nous étudierons celles qui utilisent comme réactif la fuchsine, la fluorescéine et la phénolsulfonephtaléine. Nous ne ferons que citer la méthode au chlorure d'or qui consiste à traiter la solution de bromure par une solution de chlorure d'or ; on obtient des colorations brunes que l'on compare avec des solutions étalons traitées parallèlement. Cette méthode a été critiquée par Ch. O. GUILLAUMIN et B. MEREJKOWSKI [6] : c'est d'une part une méthode peu sensible : elle permet d'apprécier de 0,5 à 4 mg.

de bromure avec une erreur variant de 1 à 14 p. 100. D'autre part, si cette méthode donne d'assez bons résultats sur des solutions pures de bromure, la seule présence de NaCl aux doses susceptibles d'être rencontrées dans les tissus organiques, atténuerait la coloration de 15 à 17 p. 100.

*
**

Pour toutes nos mesures colorimétriques, nous avons employé le *photomètre de Pulfrich*, fabriqué par ZEISS. En voici une description succincte d'après les notices données par le fabricant.



Coupe schématique du photomètre de Pulfrich.

L'instrument est optiquement disposé de telle sorte que la lumière, qui y pénètre par deux ouvertures photométriques, parvienne jusqu'à un oculaire commun. En regardant à travers cet oculaire, l'observateur voit le champ lumineux, divisé en deux parties demi-circulaires par une ligne de séparation verti-

cale, chacune de ces deux parties n'étant éclairée que par l'une des ouvertures d'entrée. Du côté de l'oculaire se trouve un dispositif qui permet d'intercaler dans le parcours des rayons lumineux une série de filtres de couleurs différentes. Le dispositif de mesure est constitué par deux tambours identiques, solidaires de deux diaphragmes qui permettent de faire varier l'intensité du champ dans des conditions mesurables. Ces tambours sont gradués de telle sorte que la précision de la lecture, en pour cent, soit approximativement la même, que les liquides accusent une forte ou une faible absorption. Sur les ouvertures photométriques sont disposés deux porte-cuve, dont chacun est destiné à recevoir une cuve de verre. L'une de ces cuves reçoit le liquide à examiner, tandis que l'autre est remplie d'un liquide de compensation, qui, pour nos mesures, a toujours été de l'eau.

Nous avons utilisé des micro-cuves, qui présentent l'avantage de ne nécessiter que de très petites quantités de liquide (0,2 cm³ pour une cuve de 1 cm d'épaisseur). Les filtres spectraux employés ont été ceux de la série S : Chacun de ces filtres laisse passer une région du spectre mesurant 45 mμ environ et partageant le spectre visible entier en parties à peu près égales.

Voici la liste de ces filtres avec la longueur d'onde correspondant à leur centre de gravité en mμ.

S 75	750	S 57	572
S 72	729	S 53	530
S 66	666	S 50	494
S 61	610	S 47	463
		S 43	434

Les deux tambours de l'appareil sont gradués en intensité de lumière transmise par le liquide coloré

en pour cent de la lumière incidente d'une part et d'autre part en coefficient d'extinction. Ce coefficient d'extinction est le logarithme négatif de l'intensité lumineuse transmise. Il présente l'avantage d'être directement proportionnel à la concentration du colorant observé. Toutes les mesures photométriques indiquées dans ce travail sont exprimées en coefficient d'extinction. Dans un certain nombre de cas, ce coefficient sera indiqué avec 3 décimales ; signalons dès maintenant que la troisième décimale n'est rapportée qu'à titre indicatif.

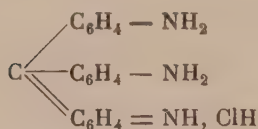
Les rapports entre l'intensité de la lumière transmise et le coefficient d'extinction sont les suivants :

Intensité de la lumière transmise	Coefficient d'extinction
—	—
10 p. cent	1,000
50 —	0,301
90 —	0,046
95 —	0,022
99 —	0,004

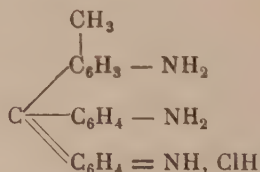
CHAPITRE I.

MÉTHODES A LA FUCHSINE.

On désigne sous le nom de *Fuchsine* la matière colorante que l'on obtient par oxydation (Chlorure d'étain, nitrates mercurieux et mercurique ou mieux acide arsénique) d'un mélange d'aniline, o. toluidine, p. toluidine, mélange connu sous le nom d'huile pour rouge ; le principal constituant de la fuchsine est la rosaniline (dérivé du triphénylméthane) : chlorhydrate ou acétate de l'anhydro-p-triamino-diphénylm-totyl-carbinol, $C_{20}H_{19}N_3HCl$, 4 H_2O , avec un peu de pararosaniline.



Chlorhydrate de pararosaniline.



Chlorhydrate de rosaniline.

La fuchsine se présente en beaux cristaux vert cantharide, à éclat métallique. Elle est peu soluble dans l'eau, plus soluble dans l'alcool. Les solutions sont rouge carmin.

La fuchsine fixe l'acide sulfureux en conduisant à l'acide fuchsine-sulfureux incolore, très soluble. La solution incolore se colore en rouge sous l'influence

des aldéhydes et peut, par suite, être utilisée comme réactif de ces composés (Réactif de SCHIFF).

La fuchsine, traitée par un acide fort, surtout SO_4H_2 et également HCl , donne un dérivé incolore : ce dernier se recolore par neutralisation et même par simple dilution. Ce produit décoloré est à la base du réactif de DENIGÈS-CHELLE.

Le brome donne avec ce réactif, immédiatement, un composé coloré, rouge-violet, non décoloré par l'hyposulfite, colorant différant à la fois de la fuchsine et des dérivés obtenus par action des aldéhydes sur le réactif de SCHIFF, ainsi qu'on peut s'en rendre compte en examinant les spectres de ces divers colorants. Le chlore dans les mêmes conditions, mais avec une vitesse moins grande, donne une matière colorante jaune. G. SCHEUING et C. SCHAAFF [10], étudièrent en 1923 cette action du brome sur la fuchsine, entrevue par CARO et GRAEBE, retrouvée par DENIGÈS puis par GUARESCHI ; ils conclurent à la formation immédiate d'un dérivé non décolorable par le gaz sulfureux ou par les acides forts, hexabromé pour la parafuchsine et vraisemblablement tétrabromé pour la fuchsine dont le groupement méthyle génèrait la substitution dans un des noyaux.

Les différentes méthodes qui ont utilisé la fuchsine comme réactif peuvent se classer suivant le mode d'oxydation employé pour déplacer le brome. Les unes utilisent le chromate de potassium en milieu sulfurique : c'est dans ce groupe que nous trouvons la méthode originelle de G. DENIGÈS et L. CHELLE [11] et les diverses modifications de A. DAMIENS, [12], Ch. O. GUILLAUMIN et B. MEREJKOWSKI [13], Mlle L. OLSZYCKA [14]. Le deuxième groupe est constitué par

la méthode de J. FREZOULS [15] qui déplace le brome par le persulfate d'ammonium en milieu sulfurique.

Nous allons d'abord exposer ces différentes méthodes, puis nous donnerons les résultats que nous avons obtenus avec celles-ci, enfin nous terminerons ce chapitre en indiquant les recherches que nous avons faites sur ce sujet.

Méthode primitive de Denigès.

C'est en 1912 que GUARESCHI [16], de TURIN et G. DENIGÈS [17], de Bordeaux, dans des recherches absolument indépendantes, ont trouvé que le réactif de SCHIFF ou fuchsine bisulfitée fournissait, avec le brome libre, un dérivé bromé de grande intensité colorante. Le produit que l'on obtient ainsi est insoluble dans l'eau, le benzène, l'oxyde d'éthyle, l'éther de pétrole et le sulfure de carbone, un peu soluble dans la fuchsine bisulfitée ; très soluble dans les alcools méthylique, éthylique et allylique, dans l'acétone, l'acide acétique, le chloroforme et le tétrachlorure de carbone. Les solutions dans ces deux derniers dissolvants, violette ou rouge-violet suivant leur concentration, présentent un spectre d'absorption à deux bandes, dont l'une dans le bleu, est faible et mal délimitée, et dont l'autre très nette, dans le jaune orangé, correspond dans son milieu au $\lambda = 580$. Le chloroforme et le tétrachlorure de carbone l'enlèvent très aisément à ses solutions dans le bisulfite de rosaniline et dans l'eau alcoolisée ou acétique, tandis que les mêmes dissolvants sont sans action sur les solutions, aussi concentrées soient-elles, de fuchsine ou des produits de condensation colorés que donnent les aldéhydes avec la fuchsine bisulfitée.

Ces faits furent communiqués par GUARESCHI [16], à l'Académie des Sciences de Turin, le 28 avril 1912, tandis que G. DENIGÈS [17] les communiquait le 7 octobre 1912 à l'Académie des Sciences de Paris et le 24 octobre à la Société de Pharmacie de Bordeaux. L'antériorité tout au moins de publication revient donc au savant italien ; néanmoins, les publications du savant français présentent les détails intéressants suivants :

Au lieu d'employer uniquement, comme le savant italien, un papier imprégné du réactif pour déceler les traces de brome, G. DENIGÈS a montré que l'on pouvait faire la réaction directement dans le liquide, à condition d'opérer en présence d'eau oxygénée qui empêche l'action du brome sur le bisulfite : dans l'un comme dans l'autre cas, d'ailleurs la limite de sensibilité est d'environ 0,010 mg.

Méthode de G. Denigès et L. Chelle.

L'emploi du réactif de SCHIFF pour la recherche du brome n'offre qu'un intérêt historique ; en effet, peu après, à la séance du 18 novembre 1912, de l'Académie des Sciences de Paris, G. DENIGÈS et L. CHELLE [18] communiquaient l'emploi d'un nouveau réactif, constitué par de la fuchsine préalablement décolorée par SO_4H_2 . Ce nouveau réactif est plus sensible que le précédent et permet le dosage de traces de brome ; d'autre part, il peut être mélangé sans inconvénients avec les persels de fer ou un mélange sulfochromique, et réagir ainsi sur les deux halogènes (l'iode est sans action sur la fuchsine décolorée par les acides minéraux, comme d'ailleurs sur le réactif de SCHIFF).

Voici la méthode indiquée par ces auteurs :

RÉACTIF. — Verser 10 cm³ d'une solution de fuchsine au millième dans 100 cm³ d'acide sulfurique au vingtième en volume, préparé en mélangeant 5 cm³ d'acide sulfurique pur, concentré, avec une quantité d'eau distillée suffisante pour faire 100 cm³ et laissant refroidir. Le mélange se décolore peu à peu (1). En moins d'une heure, il est prêt pour l'emploi, et est inaltérable ; nous le désignerons dans ce qui va suivre par la lettre R.

OPÉRATION. — 1° Cas du chlore et du brome libres. On prépare à l'avance un mélange de 25 cm³ de R., de 25 cm³ d'acide acétique cristallisable pur et de 1 cm³ d'acide sulfurique. A 5 cm³ du liquide L. ainsi obtenu, versés dans un tube à essai, on ajoute un volume, variant de 1 goutte à plusieurs cm³, de la solution à essayer et on agite.

Le mélange prend une coloration jaune avec le chlore, rouge-violet avec le brome ; si on l'agite très vivement avec 2 cm³ de chloroforme (qu'on peut remplacer si l'on veut par le tétrachlorure de carbone), le dissolvant se colore en jaune dans le premier cas, dès que la dose de l'halogène atteint 0,05 mg. dans la prise d'essai ; en rouge-violet, avec le brome, même pour des quantités dix fois moindre, soit 0,005 mg.

Dans les deux cas, (sauf s'il y a excès de chlore et alors toute la matière colorante formée est prise par le chloroforme), le produit coloré halogéné se partage entre les deux dissolvants. L'addition de trois volumes d'eau environ dans le cas du chlore, d'un volume de ClH étendu à moitié dans celui du brome, rompt le partage aux dépens de la couche aqueuse qui se décolore presque.

(1) On pourrait préparer encore ce réactif en remplaçant, dans la formule précédente, les 5 cm³ de SO₂H₂ pur par 20 cm³ de HCl pur (D = 1,18 à 1,19). Seulement ce dernier réactif ne peut servir à la recherche directe du chlore combiné.

Avec le brome, la couche chloroformique présente les deux bandes d'absorption — dans le bleu et le jaune — dont la plus intense, dans le jaune, correspond dans son milieu au $\lambda = 580$.

Quant au dérivé chloré jaune, il ne ressemble en rien à celui que donne le réactif de SCHIFF avec le chlore.

Si le chlore et le brome, au lieu d'être dissous, sont en vapeurs suffisamment concentrées, on les capte sur une goutte de lessive de soude portée, avec une baguette de verre, d'abord dans l'atmosphère à explorer, puis dans les 5 cm^3 de L.

Si ces vapeurs sont diffusées dans une atmosphère inerte, on les fait traverser soit le réactif, soit une petite quantité d'eau alcaline, qu'on ajoute ensuite au réactif. Les halogènes, mis en contact avec les alcalis, sont d'abord transformés en $\text{XM} + \text{XOM}$, mélange qui les régénère au contact de l'acide du réactif, ce qui fait que, dans ces divers cas, on observe finalement les colorations plus haut indiquées.

2° Cas du brome et du chlore combiné. Nous n'examinerons ici que le cas des combinaisons métalliques binaires auxquelles on peut aisément ramener toutes les autres.

Premier procédé. — L'iode étant préalablement éliminé par les persels de fer à chaud, on libère le brome par $\text{SO}_4\text{H}_2 + \text{CrO}_4\text{K}_2$. Dans l'atmosphère gazeuse, on capte le brome en y promenant l'extrémité, imbibée de soude, d'une baguette de verre qu'on met ensuite en contact avec le réactif L. avec agitation ultérieure avec le chloroforme, comme il est dit précédemment. On opère de même pour le chlore, après avoir éliminé I et Br par le mélange sulfochromique à chaud, on ajoute MnO_4K , on capte par la soude le

chlore libéré et on fait agir l'halogène ainsi fixé sur le réactif L. Ce premier procédé est surtout applicable à la diagnose rapide des chlorures et des bromures isolés ou mélangés.

Deuxième procédé applicable particulièrement à la diagnose et au dosage de traces de brome dans les matières organiques et les eaux naturelles. A 5 cm³ du liquide à essayer on ajoute 0,2 cm³ de ClH (1). (D = 1,18 à 1,19), 1 cm³ de SO₄H₂ concentré, 1 cm³ du réactif fondamental R ; et 0,2 cm³ d'une solution à 10 p. 100 de CrO₄K₂. On agite après chaque addition et, sans laisser refroidir (2), on ajoute 1 cm³ de chloroforme puis on agite très vivement pendant au moins une demi-minute.

Si l'eau renferme au moins 1 mg. de brome (à l'état de bromure) par litre, le chloroforme se dépose coloré en violet.

Modification de G. Denigès et L. Chelle.

En 1917, G. DENIGÈS et L. CHELLE [19] furent appelés à modifier leur technique pour les raisons suivantes : ils avaient remarqué que des traces de nitrites avaient une influence perturbatrice sur le dosage et se sont demandés si cette influence n'était pas fortement exaltée par la température (40 à 50°) à laquelle ces auteurs conseillaient d'opérer, afin d'obtenir une réaction quasi instantanée et s'il n'était pas plus avantageux de sacrifier rapidité à sécurité pour annihiler

(1) Dont la présence, sans doute par catalyse et formation transitoire de chlorures de chromyle, favorise singulièrement la libération du brome sous l'influence du mélange sulfochromique.

(2) Il importe pour que la réaction soit rapide, que la température du mélange atteigne 40-50° ce qui est généralement réalisé par l'action seule de l'acide sulfurique, au moins l'été. Si ce résultat n'est pas obtenu, on rechauffe le mélange jusque vers 50°, soit directement, soit en l'immergeant dans un bain d'eau liquide.

les causes d'erreur pouvant provenir de la présence de l'ion nitreux. Après de multiples expériences, G. DENIGÈS et L. CHELLE ont trouvé qu'en se soumettant à ne point opérer à une température supérieure à 20°, on pouvait retrouver très aisément jusqu'à 1 mg. de brome-ion, par litre de solution, en présence de plus de mille fois son poids de nitrite de sodium, à la condition, bien entendu, que l'ion chromique soit toujours en quantité suffisante dans le mélange final sur lequel il agit.

En conséquence, voici la nouvelle technique proposée :

A 5 cm³ de solution bromurée (dont le titre ne doit pas dépasser 1 g. de brome-ion par litre) versés dans un tube à essai, ajouter IV gouttes d'acide chlorhydrique pur, IV gouttes de chromate de potasse à 10 p. 100, 1 cm³ d'acide sulfurique pur et agiter. Plonger le tube aussitôt dans de l'eau froide (15 à 16°) et l'y laisser cinq minutes au moins. Ajouter 1 cm³ de réactif fuchsiné, 1 cm³ de chloroforme (1) et agiter vivement pendant au moins une minute.

Laisser déposer ; le chloroforme se colorera en rose d'autant plus intense que l'ion brome sera plus abondant dans le mélange.

Technique de A. Damiens.

En 1920, A. DAMIENS [20] a employé la réaction de DENIGÈS et CHELLE légèrement modifiée ; l'auteur indique que ces modifications ont été faites suivant les indications contenues dans le rapport de M. LEBEAU,

(1) Le chloroforme employé aura été, au préalable, bien lavé avec de l'eau pour le débarrasser de toute trace d'alcool, puis décanté ou filtré. Sans cela, l'alcool qu'il peut contenir réduit plus ou moins vite le mélange sulfo-chromique surnageant, ce qui se constate par la coloration verdâtre (formation de sulfate chromique) qu'il prend et ce qui peut en atténuer l'action.

à l'inspection des Etudes et expériences chimiques (Rapport n° 200 en date du 20 mars 1916).

A 10 cm³ de la solution étudiée, on ajoute successivement :

0,4 cm³ d'acide chlorhydrique,
2 cm³ d'acide sulfurique,

On laisse refroidir puis on ajoute :

0,4 cm³ de solution de chromate de potassium à 10 p. 100.

On laisse en repos 10 minutes (1), puis on ajoute :

2 cm³ de réactif DENIGÈS et CHELLE (Fuchsine sulfurique)
2 cm³ de chloroforme.

On agite vivement 30 secondes, et l'on abandonne au repos.

En présence de brome, le chloroforme présente une coloration violacée.

Cette technique se distingue de la technique primitive de DENIGÈS et CHELLE en ce que la réaction est faite à froid, et non plus à 40 ou 50°. De cette façon les teintes obtenues sont plus foncées, pour une même quantité de brome, et les résultats sont beaucoup plus constants.

Comme nous venons de le voir, ce mode opératoire définitif a été également adopté par MM. DENIGÈS et CHELLE avec cette seule différence que, après l'addition de chromate, la liqueur est laissée en repos pendant 5 minutes seulement. Le résultat est le même qu'après 10 minutes, d'après A. DAMIENS.

Le réactif ainsi employé se prête parfaitement au dosage de quantités de brome intermédiaires entre 0,005 et 0,10 mg. L'approximation des résultats est de 0,005 pour des quantités intermédiaires entre 0,005 et 0,05 mg., de 0,01 entre 0,06 et 0,10 mg. Au dessus de

(1) Dans sa thèse, Mlle C. CHATAGNON [20 bis], élève de A. DAMIENS, indique 20 minutes.

0,10 mg., les teintes se différencient mal et le dosage direct est peu précis. On ne peut l'obtenir qu'en diluant le chloroforme, pour amener sa teinte dans l'intervalle de 0,04 à 0,005 mg. Au dessus de 0,50 mg. cette dilution devient peu praticable et peu sûre. Si l'on soupçonne dans la solution étudiée une telle proportion de brome, il est bon de n'opérer que sur une fraction seulement.

La coloration du chloroforme s'atténuant assez rapidement, les tubes témoins ne peuvent être conservés. Pour chaque série de dosage, ils doivent être préparés à nouveau.

Il est intéressant pour l'interprétation des résultats de calculer, d'après les indications précédentes, l'erreur relative inhérente à ce dosage. Elle varie évidemment avec la quantité de brome trouvée.

	p. 100
Pour 0,01 mg. L'erreur est d'environ.....	50
— 0,02 mg. — — —	25
— 0,03 mg. — — —	16,6
— 0,04 mg. — — —	12,5
— 0,05 mg. — — —	10
Entre 0,06 et 10 mg. l'erreur est d'environ de 16 à ..	10
Entre 0,10 et 50 mg. l'erreur est d'environ.....	10

Toutes les recherches de A. DAMIENS ont été faites avec un réactif obtenu avec un échantillon de fuchsi-ne que DENIGÈS et CHELLE ont mis à sa disposition. Cette fuchsi-ne qui avait servi à leurs études antérieures donnait un réactif sensiblement incolore, résultat que A. DAMIENS n'avait pu obtenir avec les fuchsi-nes commerciales alors à sa disposition.

Technique de Ch.-O. Guillaumin et B. Merejkowski [21].

Ces auteurs suivent à peu près la même technique que A. DAMIENS, mais ils ajoutent un peu de nitrite de

soude et modifient l'ordre d'utilisation des réactifs, ce qui leur semble augmenter la sensibilité de la réaction. Ils opèrent en comparant avec deux étalons, l'un de 10 γ et l'autre de 50 γ :

	Essai	Etalon I (10 γ)	Etalon II (50 γ)
Solution de bromure....		2 cm ³	10 cm ³
Eau distillée	Q.S.P.	10 cm ³	10 cm ³
Sol. de nitrite de sodium	0,1	0,1	0,1
Gtte à gtte SO ₄ H ₂ pur...	2	2	2
HCl pur	0,4	0,4	0,4

Mélanger. Les tubes bouchés à l'émeri et numérotés sont portés dans un bain d'eau froide ; on verse ensuite :

Solution de chromate.....	0,4	0,4	0,4
Repos 5 minutes, puis on ajoute :			
Réactif sulfofuchsine.....	2	2	2
Chloroforme	2	2	2

On agite pendant une minute, on laisse reposer. Les solutions chloroformiques mauves ou violettes sont décantées, si nécessaire, à l'aide d'une ampoule à robinet, elles sont portées au colorimètre, où l'on compare la coloration de l'essai avec le plus proche des étalons placé sous 20 mm., en suivant les règles habituelles de la colorimétrie. (Pour son usage personnel, Ch. O. GUILLAUMIN emploie le photomètre de PULFRICH en examinant la coloration exactement au bout de 10 minutes).

Technique de Mlle L. Olszicka [22].

Ayant d'abord employé le mode opératoire donné par A. DAMIENS, Mlle L. OLSZICKA s'est aperçue en préparant plusieurs séries d'étalons que des anomalies se produisaient souvent dans le développement de la teinte ; pour éviter ces perturbations, Mlle L. OLSZICKA

a cru préférable, comme l'avait indiqué A. DAMIENS, de rester entre les limites de 10 à 50 γ et de comparer les teintes obtenues au photomètre de PULFRICH. Dans ces conditions, cet auteur a fait un certain nombre de remarques : le temps de contact de la solution contenant le brome avec le mélange sulfochromique est d'une importance capitale, un contact trop prolongé ayant pour effet une réoxydation en bromates de petites quantités de brome libérées par le chromate. On aurait donc avantage, pour avoir des résultats constants, à employer une quantité assez importante de chromate (0,8 cm³) et à ajouter le chloroforme immédiatement après. Cependant, la réaction n'en reste pas moins délicate et l'opération doit être conduite avec régularité et rapidité. En prenant toutes ces précautions l'auteur a pu obtenir des dosages de brome pour des doses de 10 à 40 γ avec une erreur de 3,5 à 4 p. 100.

Méthode de J. Frezouls [23].

Cet auteur a essayé avec des résultats variables de libérer le brome par l'action des persulfates alcalins. Il a réussi à obtenir une réaction régulière en employant les persulfates en solution dans l'acide sulfurique concentré. Une telle solution se comporte comme de l'acide de Caro : sa composition est discutée, BAYER et VILLIGER la considérant comme contenant de l'acide monopersulfurique $\text{SO}_2 \begin{smallmatrix} \text{O-OH} \\ \text{OH} \end{smallmatrix}$ alors que des recherches plus récentes tendent à y démontrer la présence de toute une série de dérivés peroxydés de l'acide sulfurique.

Ce réactif, concentré ou étendu, met en liberté instantanément l'iode des iodures, déplace plus lente-

ment le brome des bromures et met en liberté de petites quantités de chlore. Mais si au lieu de dissoudre le persulfate dans l'acide sulfurique concentré, on le dissout dans l'acide sulfurique préalablement étendu au dixième, on obtient alors une solution qui présente les caractères analytiques de l'acide persulfurique : elle réagit lentement sur les iodures, a une action à peine perceptible sur les bromures et est sans action sur les chlorures.

On prépare le réactif en mettant simplement en contact, à la température ordinaire, 1 g. de persulfate d'ammonium avec 10 cm³ d'acide sulfurique à 66° Baumé. On écrase les grumeaux avec un agitateur et on abandonne. Au bout d'une demi-heure, on a une solution limpide qui peut être employée telle quelle dans la proportion de III gouttes pour 10 cm³ de solution bromurée ou après dilution, au dixième (en refroidissant pour éviter tout échauffement) ; dans ce dernier cas il faudra 2 cm³ de réactif pour 10 cm³ de solution bromurée. Ce produit doit être conservé à l'abri de la lumière ; son activité décroît lentement, mais il peut être utilisé pendant une quinzaine de jours. La solution concentrée paraît conserver plus longtemps son activité que la solution diluée.

Si à 10 cm³ d'une solution ne contenant pas plus de 10 mg. par litre de brome et contenant aussi des chlorures, on ajoute 2 cm³ de réactif de DENIGÈS-CHELLE, puis, immédiatement après, III gouttes de ce réactif persulfurique, le mélange, bien agité, maintenu à la température ordinaire (15 à 25°), on voit apparaître une coloration rose qui, peu à peu, devient plus intense, puis vire au rose saumon et finalement au jaune franc. On peut mieux suivre les phases successives de la réaction, si on a ajouté au début de la réaction un

peu de chloroforme et si on agite de temps en temps le mélange. Le chloroforme s'empare du dérivé bromé au fur et à mesure de sa formation et on obtient au bout d'un temps variable avec la température, les teneurs respectives en chlore et en brome et l'activité du réactif, un liquide aqueux coloré en jaune surmontant la couche de chloroforme colorée en rouge-violet.

L'acide de Caro met donc en liberté le chlore et le brome. Le chlore libéré déplace le brome et lorsque le brome est entièrement libéré, le chlore agit sur le réactif sulfofuchsiné en donnant le dérivé jaune bien moins soluble dans le chloroforme que le dérivé bromé. Si on laisse la réaction se poursuivre en l'absence de chloroforme, la coloration du brome disparaît, sans doute par formation de bromate et peut-être de chlorure de brome et cette disparition est d'autant plus rapide que la température et la teneur en chlorures, sont plus élevées et la teneur en brome plus faible. Mais si on ajoute, dès l'apparition de la teinte jaune, une trace d'hyposulfite de sodium (1 goutte d'hyposulfite N/10) la teinte jaune disparaît et la réaction subit un temps d'arrêt. La température la plus favorable est entre 15 et 25°. Au dessus de 30°, la teinte jaune du dérivé chloré se forme très vite et la coloration rose du dérivé bromé réapparaît très affaiblie après l'addition d'hyposulfite et peut même ne pas réapparaître. La présence des chlorures favorise la réaction, mais on peut l'obtenir en l'absence de chlore : la mise en liberté du brome est, dans ce cas, très lente et incomplète. Si, d'autre part, on essaye le réactif sur des solutions exemptes de brome, on obtient immédiatement la teinte jaune caractéristique du chlore, la présence de traces de brome (1 ou 2 γ) ayant

pour effet de retarder l'apparition de cette coloration jaune, phénomène qui s'observe nettement en présence d'un témoin sans brome et qui semble être la seule réaction permettant de déceler la présence de traces de brome avec le réactif de DENIGÈS-CHELLE qui ne donne aucune coloration avec ces faibles teneurs.

Pour le dosage par observation directe, on se sert de tubes à essais ordinaires. On prend 20 cm³ de réactif de DENIGÈS-CHELLE, III gouttes de réactif persulfurique, 2 cm³ de chloroforme, exactement mesurés, et l'on agite de temps en temps en ayant soin d'agiter tous les tubes aussi fréquemment l'un que l'autre. Quand la teinte jaune apparaît, on ajoute I goutte d'hyposulfite N/10 et on compare l'intensité du tube problème avec celle des solutions bromurées types. On arrive à une approximation qui ne dépasse pas 5 mg. par litre et qui est généralement de 2 à 3 mg.

J. FREZOULS a d'autre part montré que lorsque l'on agite les solutions aqueuses ou chloroformiques du dérivé bromé de la fuchsine avec du talc ou de la terre d'infusoires, le colorant est fixé intégralement par ces divers adsorbants. Si on recueille cet adsorbant par centrifugation, on peut le laver sans perte par de l'eau acidulée. Le colorant passe ensuite très facilement en solution dans l'alcool méthylique ou éthylique acidifié par l'acide sulfurique ; on obtient de véritables solutions que l'on peut filtrer. Le dérivé chloré jaune est, au contraire, insoluble dans ces solvants. J. FREZOULS propose donc un autre dosage par centrifugation en opérant de la façon suivante : Dans 4 tubes à centrifuger, on place la solution à doser et les solutions bromurées types sous un volume de 10 cm³ ; on ajoute 2 cm³ exactement mesurés de

réactif sulfofuchsiné et III gouttes du réactif persulfurique ; on agite et on met le compteur à secondes en marche. On pèse au trébuchet 4 fois 5 cg. de terre d'infusoires et au bout de 7 minutes on introduit 5 cg. de terre d'infusoires dans chacun des tubes, on agite bien et on centrifuge. On observe alors la couche aqueuse ; si elle est colorée en rose, on remet le culot en suspension en agitant le tube et on recommence la centrifugation jusqu'à ce que le liquide apparaisse coloré jaune. C'est un point qu'il faut s'attacher à saisir le plus exactement possible, car un contact trop prolongé du dérivé bromé avec le chlore risque de donner des résultats faibles, de même que l'addition prématurée d'hyposulfite. La couleur jaune apparaît d'autant plus vite qu'il y a moins de brome, on ajoute alors 1 goutte d'hyposulfite N/10 dans chaque tube dès qu'il est coloré en jaune, on agite, centrifuge, décante, lave à deux reprises avec de l'eau acidulée par l'acide sulfurique (1 p. 100) et décante à fond en renversant entièrement le tube. Les centrifugations doivent être faites aussi rapidement que possible ; la sédimentation est d'ailleurs presque instantanée et on obtient un culot très adhérent au fond du tube.

Avec une pipette on ajoute dans chaque tube 20 cm³ exactement mesurés d'alcool contenant 5 p. 100 en volume d'acide sulfurique. Avec un agitateur, on met le culot en suspension en détruisant tous les grumeaux. La dissolution est complète au bout de quelques minutes. On filtre ou on centrifuge et on a une solution limpide colorée en violet intense, tandis que, sur le filtre ou dans le culot, il reste une poudre colorée légèrement en jaune par le dérivé chloré. On compare au colorimètre successivement chaque type avec le tube problème. J. FREZOUIS dose ainsi des quanti-

tés de l'ordre de 70 à 80 γ avec une erreur inférieure à 2 p. 100 d'après les chiffres donnés par l'auteur.

Comparaison de ces différentes méthodes.

Nous avons cherché à comparer ces différentes méthodes en observant la coloration au photomètre de PULFRICH sous une épaisseur de 2 cm. Le volume de chloroforme employé a toujours été de 2 cm³. Pour la technique de A. DAMIENS, nous avons d'abord pris le temps de 20 minutes de contact indiqué par Mlle C. CHATAGNON, puis pour avoir des conditions se rapprochant plus des autres méthodes, nous avons refait les colorations en prenant le temps de 5 minutes. Pour la technique de Ch. O. GUILLAUMIN et B. MERZKOWSKI, nous avons suivi strictement la marche indiquée par l'auteur. Pour ces deux méthodes, nous avons effectué les mesures photométriques 10 et 20 minutes après l'extraction par le chloroforme. Pour la technique indiquée par Mlle L. OLSZICKA, nous avons agité pendant 5 minutes, (ne sachant pas le temps employé par l'auteur) nous avons attendu encore 5 minutes et nous avons ainsi fait la première lecture photométrique 10 minutes également après l'addition du chloroforme, et la deuxième 10 minutes après. Pour la technique indiquée par J. FREZOULS, nous avons agité jusqu'à coloration légèrement jaune de la couche aqueuse, ce qui a demandé environ 10 minutes pour l'essai avec 50 γ de brome et 5 minutes pour l'essai avec 10 γ . Nous avons encore attendu 5 minutes pour la première mesure.

Voici rappelés brièvement sous forme de tableau les différentes méthodes examinées.

	A. DAMIENS —	Ch.-O. GUILLAUMIN et B. MEREJKOWSKI	Mlle OLSZYCKA
Solution étudiée.....	10 cm ³	10 cm ³	10 cm ³
Solution de nitrite de sodium.....		0,1	
Acide chlorhydrique.....	0,4	0,4	0,4
Acide sulfurique	2	2	2
On laisse refroidir.			
Solution de chromate de potassium..	0,4	0,4	0,8
On laisse au repos.....	10 min.	5 min.	
Réactif de DENIGÈS-CHELLE.....	2	2	2
Chloroforme.....	2	2	2

	J. FREZOULS
Solution étudiée.....	10 cm ³
Réactif de DENIGÈS-CHELLE.....	2
Réactif persulfurique.....	III gouttes
Chloroforme.....	2

Voici les chiffres que nous avons obtenu (tableau ci-après).

Nous pouvons tirer de ces quelques chiffres un certain nombre de remarques :

1° L'absorption maximum de lumière est obtenue avec l'écran S 57. Or Mlle L. OLSZYCKA [24] indique dans son article l'emploi du filtre S 47. L'examen de nos chiffres obtenus en fonction de la nature du filtre montre que le filtre S 47 ne présente aucun intérêt. Ce chiffre 47 est probablement une erreur typographique.

2° Les observations faites après dix minutes sont meilleures que celles faites après vingt minutes. Ceci semble indiquer une altération rapide du colorant formé. On peut admettre une diminution de l'intensité du colorant de l'ordre de 20 p. 100 entre la 10^e et la 20^e minute.

3° La quantité de matière colorante formée pour une quantité déterminée de brome varie avec la méthode.

Brome	Ecrans	A. DAMIENS (20 min.)		A. DAMIENS (5 min.)		Ch. O. GUILLAUMIN et B. MEREKOWSKI		Mlle OLSZICKA		J. FREZOULS	
		10 min.	20 min.	10 min.	20 min.	10 min.	20 min.	10 min.	20 min.	10 min.	20 min.
50 γ	S 43	0,08	0,08	0,08	0,08	0,17	0,16	0,26	0,23	0,24	0,22
	S 47	0,20	0,18	0,20	0,17	0,41	0,37	0,41	0,36	0,63	0,52
	S 50	0,42	0,33	0,40	0,32	0,90	0,75	0,74	0,63	0,97	0,72
	S 53	0,52	0,41	0,52	0,40	1,12	0,90	0,86	0,73	1,05	0,81
	S 57	0,84	0,68	0,86	0,66	2,00	1,60	1,45	1,21	4,55	4,14
	S 61	0,16	0,13	0,15	0,12	0,27	0,23	0,23	0,19	0,19	0,18
	S 66	0,03	0,01	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03
	S 43		0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,03	0,07	0,07
10 γ	S 47		0,10	0,10	0,09	0,11	0,09	0,05	0,05	0,20	0,20
	S 50		0,16	0,16	0,15	0,19	0,15	0,09	0,08	0,32	0,30
	S 53		0,19	0,19	0,17	0,24	0,19	0,10	0,09	0,38	0,34
	S 57		0,27	0,27	0,24	0,35	0,27	0,14	0,12	0,54	0,48
	S 61		0,05	0,05	0,10	0,10	0,06	0,02	0,02	0,09	0,07
	S 66		0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02

Ces chiffres indiquent le coefficient d'extinction (voir p. 17) de la solution chloroformique sous un volume de 2 cm³ et pour une épaisseur de 20 mm.

4° Si on compare les chiffres obtenus avec 10 γ et avec 50 γ on voit que le rapport varie avec les méthodes.

On est ainsi amené à conclure qu'on se trouve en présence d'un ensemble complexe de réactions. Pour obtenir des résultats utilisables, il est donc nécessaire d'opérer dans des conditions rigoureuses et d'utiliser le système des témoins, ce à quoi ont été amenés tous les auteurs qui ont utilisé cette méthode.

Bien que cet artifice permette d'obtenir des résultats intéressants, il n'en reste pas moins que ces méthodes ne permettent pas de descendre au dessous de 5 γ , qui est une limite insuffisante pour le problème que nous nous sommes posé.

C'est pourquoi nous avons essayé de sensibiliser la méthode en transformant le brome en bromate, qui en milieu acide et en présence d'un excès de bromure devait donner une quantité de brome 6 fois plus grande.

Essai de modification de la méthode.

Voici, brièvement exposés, les essais, plus ou moins infructueux que nous avons fait avec le réactif de DENIGÈS-CHELLE :

Essai de sensibilisation.

Dans nos premières recherches sur ce sujet, nous opérons en milieu chlorhydrique trop faible (de 0,1 à 1 cm³ d'HCl pur pour environ 10 cm³ de volume total). Il se produisait une pellicule de la matière colorante au contact de la solution aqueuse et du chloroforme. Nous avons réussi à éviter cet inconvénient en

acidifiant plus fortement notre milieu (5 cm³ d'HCl pur). Malgré cette modification, les résultats obtenus ne furent pas très réguliers.

Accusant alors la réaction bromure-bromate, nous avons essayé, sans aucun succès, l'emploi de quelques catalyseurs qui sont indiqués pour la réaction bromate-iodure, tels que molybdate d'ammonium, chromate de potassium, sulfate de cuivre, perchlorure de fer, alun de fer ammoniacal.

Essai des adsorbants.

Dans un autre ordre d'idée, nous avons également étudié l'adsorption de la matière colorante par la terre d'infusoires, le talc et un charbon adsorbant (Norit) ainsi que l'indique J. FREZOULS. Nous devons d'abord signaler que nous n'avons pu obtenir un réactif de DENIGÈS-CHELLE absolument incolore. J. FREZOULS indique de décolorer par le talc ou la terre d'infusoire ; après plusieurs traitements on obtient une solution de moins en moins colorée, mais aussi, semble-t-il, de moins en moins active. Nous avons donc été obligé d'employer un réactif très légèrement coloré.

Au lieu d'opérer comme J. FREZOULS dans un tube de centrifugeur, nous avons jugé préférable, après traitement par un des adsorbants, de filtrer sur un filtre en verre poreux et, après lavage, de traiter directement sur le filtre le résidu de la filtration et de recueillir le soluté dans un petit tube placé sous le filtre poreux. Nous avons tout de suite été amené à constater que les réactifs de DENIGÈS-CHELLE préparés avec les fuchsines que nous avions à notre disposition, cédaient à l'adsorbant une matière colorante qui se dissolvait ensuite dans l'alcool sulfurique. Nous avons vérifié que ce colorant avait un spectre différent de

ceux de la fuchsine et du dérivé bromé. C'est pourquoi nous avons du substituer à l'alcool sulfurique, indiqué par J. FREZOULS, de l'acétone acidifié par de l'acide chlorhydrique dans la proportion de 1 p. 100. (On ne peut acidifier par de l'acide sulfurique, car ce dernier acide donne rapidement avec l'acétone une solution brune). Cette acétone-chlorhydrique dissout très facilement le dérivé bromé de la fuchsine mais ne dissout pas la coloration parasite que nous avons observée. Après traitement de l'adsorbant par l'acétone chlorhydrique, on peut dissoudre très facilement ce colorant en traitant l'adsorbant par l'alcool sulfurique.

Essai de la fuchsine acide.

Enfin nous avons essayé si, dans la préparation du réactif de DENIGÈS-CHELLE, on ne pouvait pas remplacer la fuchsine basique, par la fuchsine acide ou magenta acide, sel de sodium du dérivé trisulfoné, obtenu par action de l'acide sulfurique fumant sur la fuchsine.

Ce produit, très soluble dans l'eau, n'est pas décolorable par l'acide sulfurique, même concentré (2 cm³ d'acide pur dans 10 cm³ de la solution au 1/1000°). Ce colorant ne passe pas dans le chloroforme. Contrairement aux fuchsines basiques, il n'est pas retenu par le talc, mais décoloré par la Norit. Le talc agité avec la solution et lavé ensuite ne cède pratiquement rien ni à l'alcool sulfurique, ni à l'acétone chlorhydrique.

Le traitement par l'acide sulfurique a cependant produit des modifications : en effet la fuchsine acide est facilement décolorée par le bisulfite de sodium, alors que la même solution traitée par l'acide sulfurique est très difficilement décolorée.

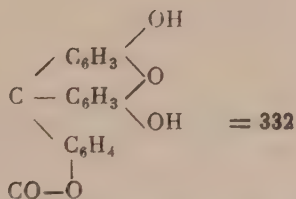
En résumé, il semble que l'on puisse utiliser la fuchsine pour la préparation d'un réactif analogue à celui de DENIGÈS-CHELLE, mais sans aucun avantage. Ce réactif serait, par ailleurs, inemployable dans la méthode de L. FREZOULS car il ne permet pas de voir apparaître la coloration jaune qui marque la fin de la réaction.

Nos essais de sensibilisation par passage au bromate ayant échoué, nous avons dû renoncer à utiliser les méthodes à la fuchsine, qui n'ont pas une sensibilité assez grande, pour le but que nous poursuivons.

CHAPITRE II.

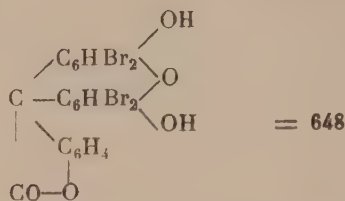
MÉTHODES A LA FLUORESCÉINE.

Le produit de la réaction de l'anhydride phtalique sur la résorcine donne la phtaléine de la résorcine, qui perd facilement une molécule d'eau par l'estérification de deux fonctions phénol demeurées libres et donne ainsi un anhydride plus avancé qui est la *fluorescéine*. On donne néanmoins à la fluorescéine le nom de phtaléine de la résorcine ou encore de dioxy-fluorane.



Elle se présente sous forme d'une poudre cristalline, rouge foncé, qui se décompose sans fondre vers 290°. Insoluble dans l'eau, elle est soluble dans l'alcool, l'éther et l'acide acétique. Sa solution alcoolique est jaune rouge avec fluorescence verte. Elle est très soluble dans les alcalis caustiques ou carbonatés et la pyridine, en donnant des liqueurs rouge sombre, ces liqueurs très diluées deviennent jaunes et montrent une fluorescence jaune vert, extrêmement brillante.

Lorsque l'on traite la fluorescéine en solution alcoolique ou plus souvent en solution acétique, par le brome, on obtient un dérivé tétrabromé qui est l'*éosine*.



Elle constitue des cristaux d'un rouge jaunâtre, cristallisant soit avec une molécule d'alcool si la cristallisation s'est faite dans l'alcool fort, soit anhydres dans l'alcool hydraté. La solution alcoolique est d'un rouge jaunâtre avec une fluorescence verte. Elle est insoluble dans l'eau. Ses combinaisons alcalines sont solubles. Les sels de potassium ou de sodium constituent les éosines solubles du commerce ; ces produits se présentent en cristaux rouge mordoré.

Méthode de A. Labat.

Le procédé de recherche du brome par la fluorescéine a été publié pour la première fois par SWARTS [25] en 1889. Ce n'est qu'en 1897 que BAUBIGNY [26] l'a de nouveau recommandé, sans avoir eu certainement connaissance des travaux de SWARTS qu'il ne cite pas. C'est d'ailleurs le nom seul de BAUBIGNY qui accompagne la citation de cette réaction dans les travaux français. Mais cette réaction a été appliquée pour la première fois en chimie biologique par BALDI [27] et par PADERI [28].

PRIBRAM [29] a fait à la méthode de ces auteurs une objection grave et non dépourvue de fondement. On sait, en effet, qu'ils caractérisent le brome en faisant

passer ses vapeurs entraînées sur un papier à la fluorescéine qui rosit par formation d'éosine. Or, il peut, dit-il, se faire parfois en même temps un dégagement d'iode ou de chlore qui provoquent aussi le virage au rose du papier réactif.

A. LABAT [30], dans ses recherches sur le brome, a également employé la fluorescéine : tenant compte des critiques de PRIBRAM, il fit les constatations suivantes : en solution aqueuse et en présence d'ammoniaque, les colorations obtenues avec le brome et l'iode ne sont pas tout à fait semblables : la coloration est plus rose pour le brome, plus orangée pour l'iode. La réaction est bien moins sensible pour l'iode : elle n'est plus perceptible pour 10 cm³ d'une solution à 2 ou 3 cg. par litre (soit 2 à 3 dixièmes de mg. d'iode). Or, dans ces conditions, 3 centièmes de mg. de brome donnent une teinte encore appréciable. Enfin, jamais le liquide rose obtenu avec l'iode ne présente un spectre à deux bandes comme celui de l'éosine. Il fournit en effet une seule bande d'absorption un peu déviée vers le rouge par rapport à celle de la fluorescéine mais jamais, même lorsqu'on ajoute un léger excès de celle-ci, on ne perçoit un double spectre comme avec le brome. La bande de la fluorescéine et celle de l'iodéosine, étant absolument voisines, se juxtaposent, mais ne paraissent jamais séparées. En somme la bande que donne le produit iodé occupe exactement l'espace séparant les deux bandes du spectre de l'éosine.

Quant au chlore, ce corps donne, d'après A. LABAT, avec le papier à la fluorescéine un composé blanchâtre et par suite à peine visible. Il en est de même quand on opère en milieu humide.

A. LABAT propose donc le mode opératoire suivant

pour rechercher et même doser le brome en solution aqueuse.

A 5 cm³ de solution, dont la concentration en brome ne doit guère dépasser 2 g. par litre, ajouter 1/10^e de cm³ de solution alcoolique de fluorescéine à 0,025 g. p. 100, agiter et verser V à VI gouttes d'ammoniaque. Dans le cas de la présence de brome, il se développe une coloration rose plus ou moins prononcée. L'examen spectroscopique, pratiqué sur le tube à réaction, ou, suivant le cas, sur le liquide versé dans une cuve ou un récipient permettant de lui donner une grande épaisseur, montre une forte bande d'absorption dans le vert et une très légère à la limite du bleu et du vert.

Méthode de F. L. Hahn [31].

Cet auteur, en 1933, a réussi à simplifier la réaction, à la rendre en même temps plus sensible et à l'adapter au dosage du brome en la laissant se poursuivre en solution homogène.

SOLUTIONS REQUISES. — On dissout 0,1 N de fluorescéine (soit 33,2 mg.) dans 5 cm³ d'une solution sensiblement 0,1 N de soude, et l'on en fait un litre par addition d'eau.

MÉLANGE TAMPON. -- Une petite partie d'une solution à peu près normale de soude est titrée par l'acide acétique ayant à peu près la même concentration (la phénolphthaléine est employée comme indicateur). En neutralisant le reste de la solution de soude par la quantité d'acide ainsi déterminée et en ajoutant un excès compris entre un dixième et un neuvième, on obtient un mélange tampon ayant un pH de 5,6 à 5,5.

OXYDANT. — Une solution à peu près décijnormale

de P-toluolchlorsulfonamate de soude est employée comme oxydant.

PROCÉDÉ. — On ajoute à la solution à examiner (soit 1 cm³) une goutte de fluorescéine, III gouttes de solution tampon, une goutte de l'oxydant. On agite et on laisse la réaction se poursuivre durant une minute ou une minute et demie.

Pour arrêter la réaction, on ajoute une goutte de solution faite avec 10 g. de soude et 1 g. d'hyposulfite de sodium dissous dans 200 cm³ d'eau. D'après l'auteur, le changement de couleur, virage du vert au rose, permet de distinguer facilement 0 — 0,1 — 0,2 — 0,4 — 0,8 — 1,3 et 2 γ de brome. En présence de quantités plus grandes de brome, on ajoutera des doses plus fortes de fluorescéine. On parvient à déterminer d'une façon très précise la teneur en brome d'une solution en la comparant à plusieurs reprises à des solutions dont la teneur en brome est connue.

Vérification de la méthode de F. L. Hahn.

Nous avons voulu vérifier la méthode de F. L. HAHN, en faisant les mesures au photomètre de PULFRICH. Nous avons alors remarqué que l'éosine en solution aqueuse présentait une bande d'absorption dont le maximum se trouvait entre les écrans S 50 et S 53, ce qui rend les mesures plus difficiles et surtout moins sensibles. Nous avons réussi à obtenir une solution d'éosine dont la bande d'absorption coïncide exactement à l'écran S 53 à la suite des remarques suivantes :

Essai de sensibilisation de la méthode.

L'éosine, en solution alcaline très diluée, ne cède rien à l'éther. A partir de pH 4 environ et au dessous,

l'éther enlève complètement l'éosine de sa solution aqueuse. Des lavages, avec une eau acidulée par un acide fort, n'enlèvent rien à l'éther, tandis que la solution de PO_4KH_2 enlève du colorant. Dans les expériences que nous avons faites à ce sujet, la solution éthérée était lavée avec une solution d'acide phosphorique (60° Bé) à 1 p. 1000 en volume.

La solution éthérée d'éosine est très peu colorée et possède par suite un très faible pouvoir absorbant. En diluant l'éther avec de l'alcool dilué la coloration augmente : si on suit la réaction au spectroscope, on remarque qu'en même temps, la bande d'absorption se déplace vers le rouge ; nous avons également observé un déplacement identique de la bande d'absorption en fonction du pH ; il y aurait donc intérêt pour avoir des colorations comparables à opérer à un pH déterminé. Nous avons employé pour cela le mélange suivant :

Alcool à 80°	100 cm ³
Acétate de sodium.....	6,80 g. (soit environ N/2)
Acide acétique pur.....	6 cm ³ (soit environ N/2)

(Nous employons de l'alcool à 80° , car l'acétate y est soluble dans 5 parties, tandis qu'il n'est soluble que dans 29 parties d'alcool à 90°). L'éosine en solution dans le mélange tampon ci-dessus donne une bande d'absorption correspondant exactement à l'écran S 53 et par suite on obtient une absorption maximum.

Pour les examens au photomètre de PULFRICH, nous avons donc adopté la technique suivante : la solution d'éosine à doser, étant sous 10 cm³, est acidifiée par V gouttes de SO_4H_2 pur et épuisée dans une petite ampoule à décantation par 2,5 cm³ d'éther. Après décantation de la partie aqueuse, la solution éthérée est

lavée avec de l'eau acidulée par de l'acide phosphorique à 1 p. 1000 en employant successivement 5, 3 puis 2 cm³ de cette solution acide ; finalement il reste environ 0,5 cm³ d'éther. On ajoute alors, à cette solution étherée, le mélange alcoolique tampon ci-dessus pour obtenir un volume final de 3 cm³ ; cette opération se fait très facilement si l'on a pris soin de tracer, sur la partie allongée de l'ampoule, un trait indiquant le volume de 3 cm³.

Nous avons vérifié qu'en employant ce mode opératoire, nous entraînions bien toute l'éosine formée ; nous avons fait l'expérience suivante :

Solution d'éosine.....	0,25, 1, 2 ou 5 cm ³
Eau sulfurique à 1 p. 100 en vol...	Q.S.P. ; 10 cm ³

Puis éther, etc... suivant le mode opératoire ci-dessus.

A l'examen au photomètre de PULFRICH sous 5 mm. d'épaisseur et à l'écran S 53, les 3 cm³ de solution colorante donnent les absorptions suivantes exprimées en coefficient d'extinction :

Pour 0,25 cm ³	0,085
Pour 1 cm ³	0,32
Pour 2 cm ³ (après dilution au demi).....	0,32
Pour 5 cm ³ (après dilution au 1/5°).....	0,315

Dans les mêmes conditions, 1 cm³ d'une solution de fluorescéine M/2000 pouvant fixer théoriquement 160 γ de brome donne une absorption pratiquement nulle (0,01).

Les avantages de l'emploi du mélange tampon et du passage dans l'éther sont indiqués par l'expérience suivante :

A). 2 cm³ d'éosine (correspondant à 32 γ de Br) Eau Q.S.P. 10 cm³ donne une absorption de 0,07.

B). 2 cm³ d'éosine mélange tampon Q.S.P. 10 cm³ donne une absorption de 0,13.

C). La même solution, après passage dans l'éther, a son volume ramené à 3 cm³ et donne ainsi une absorption de 0,45.

Après cette première question réglée, nous nous sommes aperçu qu'il nous était impossible d'obtenir des témoins nuls : quelles que fussent les conditions dans lesquelles nous nous plaçons, il nous fut impossible d'obtenir la formation d'une quantité appréciable du dérivé bromé, sans avoir dans les mêmes conditions, une réaction témoin (sans addition de brome) nous donnant une coloration pratiquement nulle. Nous avons d'abord incriminé nos réactifs, pensant que ceux-ci contenaient du brome. Après vérification de l'absence de cet halogène, nous avons examiné la pureté des fluorescéines commerciales que nous avions à notre disposition, pensant que cette coloration parasite était peut-être due à une impureté de la fluorescéine.

Pureté des fluorescéines commerciales.

Les fluorescéines commerciales que nous avons à notre disposition n'étaient pas pures. Nous nous en sommes aperçu en les dosant par fixation du brome et dosage de l'excès de ce réactif, par une méthode analogue à celle du dosage du phénol. Mais le brome ne se fixe bien sur la fluorescéine qu'à un pH supérieur ou égal à 5,5 ; on ne peut donc employer, comme générateur de brome, le mélange de bromure et bromate qui exige un pH plus bas pour libérer son brome. Nous avons donc du utiliser une solution aqueuse de broine, dans le bromure, que nous avons fixé sur la fluorescéine à doser à pH 5,5. Le brome en excès et le brome du témoin sont ensuite dosés en les faisant réagir sur de l'iodure de potassium et en do-

sant, à l'aide de l'hyposulfite de sodium, l'iode dégagé ; pour obtenir ce déplacement de l'iode des iodures, il est nécessaire de passer en milieu plus acide. Voici donc la technique que nous avons adoptée :

5 cm³ d'une solution de fluorescéine supposée être M/2000 sont traités par 1 ou 2 cm³ d'un mélange tampon acétique à pH 5,5 et 1 cm³ d'une solution de brome environ N/25. Après 3 minutes de contact, on ajoute XX gouttes de solution de IK à 20 p. 100 et XX gouttes d'acide sulfurique à 20 p. 100. Après 2 minutes, on titre l'iode dégagé par de l'hyposulfite N/100 à l'aide d'une microburette.

Les fluorescéines commerciales fixaient une quantité de brome correspondant à 60 à 80 p. 100 de fluorescéine pure.

Nous avons purifié ces produits de la façon suivante : La fluorescéine est dissoute dans la soude et traitée par de l'acide chlorhydrique ; il se forme un précipité abondant. On agite le tout dans une ampoule à décantation avec de l'éther qui s'empare de la fluorescéine précipitée. Cette solution étherée est décantée et lavée avec un peu d'eau chlorhydrique. Finalement, cette solution étherée est traitée par trois parties d'alcool à 95° et concentrée au 1/4 dans le vide. On recueille le produit précipité et le sèche à l'étuve à 37°.

Or cette fluorescéine purifiée nous a donné des témoins aussi colorés : force nous est donc d'admettre que la coloration obtenue dans les témoins est due à la formation d'un dérivé chloré de la fluorescéine. Cette conclusion nous a un peu étonné, car A. LABAT, notamment, indique que le chlore donne avec la fluorescéine un composé blanchâtre à peine visible.

Résultats obtenus avec la technique modifiée.

Nous avons essayé de contrôler la méthode de F. L. HAHN sensibilisée par notre technique en faisant varier la quantité de chloramine et le temps. Nous avons opéré de la façon suivante :

Eau (contenant 20 γ de Br).....	10 cm ³
Fluorescéine	X gouttes
(pouvant fixer au maximum 80 γ de Br).	
Tampon acéto-acétique à pH 5,5.....	XXX gouttes
Chloramine M/50 (1 goutte peut déplacer 160 γ de Br)	
quantité variable.	

Après un certain temps, on bloque la réaction par X gouttes d'hyposulfite (formule de HAHN). Puis, après acidification par X gouttes de SO_4H_2 , on entraîne dans l'éther suivant la technique décrite précédemment. Voici les résultats trouvés exprimés en coefficient d'extinction à l'écran S 53 sous 5 mm. d'épaisseur.

Voir tableau page suivante.

L'examen de ce tableau nous amène aux constatations suivantes : Pour une quantité déterminée de chloramine, lorsque l'on augmente progressivement le temps d'action de cet oxydant, on obtient des colorations de plus en plus intenses ; mais, en même temps, les témoins augmentent également d'une façon appréciable. De cette façon si l'on cherche à obtenir une différence, entre les absorptions fournies par les expériences avec le brome et sans brome, aussi forte que possible, on ne peut obtenir ce résultat que pour des temps de réaction tels que les témoins présentent eux aussi une coloration très marquée.

Si, d'autre part, l'on veut prolonger l'action de la chloramine, ou si on augmente la quantité de ce réac-

Chloramine en gouttes	Temps	30 sec.	1 min. 15 sec.	2 min.	3 min.	4 min.	5 min.	6 min.	8 min.	10 min.	15 min.	20 min.	30 min.	45 min.
V	Expérience avec 20 γ Br.	0,12	0,192	0,345	0,39	0,49	0,525	0,495	0,575	0,58	0,61	0,63	0,57	0,65
	Témoins sans Br.	0,055	0,082	0,14	0,155	0,185	0,215	0,195	0,20	0,23	0,21	0,24	0,17	0,19
	Différence	0,065	0,110	0,205	0,235	0,305	0,51	0,30	0,375	0,35	0,40	0,39	0,40	0,46
X	20 γ Br.			0,57	0,62		0,53			0,58	0,46			
	O Br.			0,18	0,20		0,18			0,12	0,07			
	Différence			0,39	0,42		0,55			0,46	0,39			
XV	20 γ Br.		0,59	0,60	0,59		0,54		0,39					
	O Br.		0,20	0,20	0,16		0,12		0,08					
	Différence		0,39	0,10	0,41		0,42		0,31					
XX	20 γ Br.		0,60	0,57	0,52		0,41							
	O Br.		0,175	0,15	0,105		0,04							
	Différence		0,425	0,42	0,415		0,37							

Ces chiffres indiquent le coefficient d'extinction (voir page 17) de la solution éthéro-alcoolique, sous un volume de 3 cm³ et pour une épaisseur de 5 mm. à l'écran S 53.

tif, on voit, d'après le tableau, que les absorptions deviennent moins intenses, aussi bien dans les expériences avec brome, que dans les expériences témoins ; on peut attribuer cette atténuation de la coloration à une action destructive de la chloramine.

Il semble donc que la réaction de F. L. HAHN soit la somme d'un certain nombre de réactions qui évoluent plus ou moins indépendamment les unes des autres.

1° Déplacement du brome par la chloramine.

2° Fixation du brome sur la fluorescéine.

3° Formation d'un dérivé chloré de la fluorescéine.

4° Action destructrice de la chloramine à la fois sur la fluorescéine, l'éosine formée et le dérivé chloré de la fluorescéine.

Or les vitesses de ces différentes réactions ne sont pas assez différentes pour pouvoir espérer obtenir la formation presque totale du dérivé bromé, avant que des quantités appréciables du dérivé chloré ne se soient formées. Pour employer cette méthode il faut donc adopter un compromis et suivre toujours très rigoureusement le mode opératoire que l'on a choisi. Néanmoins toutes les réactions qui entrent en jeu ne varient pas parallèlement. Il est donc nécessaire d'utiliser la technique des témoins comme dans le cas de la fuchsine. Dans ces conditions, il semble difficile d'atteindre avec cette méthode une approximation meilleure que 20 p. 100.

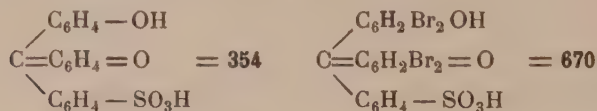
Les méthodes à la fluorescéine présentent l'avantage sur les méthodes à la fuchsine, d'opérer en milieu aqueux ; elles sont, d'autre part, plus sensibles. Néanmoins l'impossibilité d'obtenir, pour une quantité de brome donnée, des colorations suffisantes, sans

avoir des témoins de coloration peu intense, ne nous a pas fait retenir ces méthodes, d'autant plus que quelques essais nous avaient laissé espérer des résultats meilleurs en employant comme réactif la phénol-sulfonephtaléine.

CHAPITRE III.

MÉTHODES A LA PHÉNOLSULFONEPHTALÉINE.

C'est en 1935 que V. A. STENGER et I. M. KOLTHOFF [32], les premiers, employèrent la phénol-sulfonephtaléine comme réactif du brome. La phénolsulfonephtaléine ou rouge de phénol est un colorant employé pour indiquer le pH des solutions : ce corps vire en effet du jaune au rouge en passant de pH 6,4 à pH 8,0. Ce corps peut fixer 4 atomes de brome et donner le bleu de bromophénol, qui vire du jaune au bleu violet en passant de pH 3,2 à pH 4,6.



V. A. STENGER et I. M. KOLTHOFF ont trouvé que l'oxydation du bromure et que la bromuration du rouge de phénol se produisent rapidement par l'emploi de l'hypochlorite de calcium en présence de borax qui donne un pH de 8,7-8,8.

En l'absence de brome, il se forme de petites quantités du dérivé chloré du rouge de phénol : ce corps vire de pH 5,0 à pH 6,6. En faisant les comparaisons à pH 5,0-5,4, tout le rouge de phénol non bromé et les traces de dérivé chloré se trouvent dans la forme jaune ; seul le dérivé bromé sera dans sa forme alcaline, ce qui permettra un dosage colorimétrique facile.

Méthode de V. A. Stenger et I. M. Kolthoff.

Voici la méthode de ces deux auteurs :

Réactifs :

Hypochlorite de calcium : [« H.T.H. » des usines MATHISON alkali Works (New-York)] est extrait avec de l'eau et filtré de façon à avoir une solution 0,1 N. Le pouvoir oxydant est titré iodométriquement. La concentration peut varier de 10 p. 100 sans affecter les résultats d'une façon appréciable. On peut diluer au moment du besoin à 0,01 N qui est moins stable.

Rouge de phénol : On dissout 10 mg. d'un bon produit commercial dans 1 cm³ de soude 0,1 N et dilue à 100 cm³.

Solution de borax : On emploie une solution saturée de tétraborate de sodium à 25°. (On peut purifier ce sel par une cristallisation).

Solution d'acétate : On fait une solution contenant par litre 30 cm³ d'acide acétique glacial et 68 g. d'acétate de sodium trihydraté. Cette solution doit avoir un pH de 4,6-4,7, mais n'a pas besoin d'être exempte de brome.

Arsénite de sodium : On emploie une solution d'arsénite de sodium à environ 0,1 N. Elle doit être neutre, mais pas nécessairement exempte de brome.

On pourrait également employer d'autres agents réducteurs pour détruire l'excès d'hypochlorite, tel que le peroxyde d'hydrogène.

Nitrite de sodium : On emploie le produit commercial, deux fois recristallisé, en solution environ 0,5 N.

Bromure de potassium : Solution à 14,9 mg. par litre : 0,10 cm³ = 1 γ de brome.

NEUTRALISATION PRÉLIMINAIRE DE L'ÉCHANTILLON.

Si l'échantillon n'est pas neutre, on met la quantité de rouge de phénol indiqué dans la technique et on ajoute HCl ou SO_4H_2 ou de soude ou de la potasse jusqu'à coloration jaune, en faisant attention qu'il n'y ait aucun excès d'acide. La base employée devra être presque exempte de carbonate. Si des composés tels que les phosphates sont présents, des expériences séparées sont nécessaires pour déterminer les quantités d'acide ou de base nécessaires pour atteindre les pH 8,8 pendant l'oxydation et 5,4 pendant la comparaison.

Technique :

1° Pour des quantités de 1 à 4 γ de brome.

Dans un petit tube, on mesure 1 cm^3 de l'échantillon et on ajoute 0,05 cm^3 de rouge de phénol et 0,20 cm^3 de la solution de borax. On ajoute ensuite 0,20 cm^3 d'hypochlorite N/100. On laisse en contact 4 minutes en agitant de temps en temps ; on ajoute ensuite 0,05 cm^3 de la solution d'arsénite N/10 et 0,20 cm^3 de la solution acéto-acétique. On compare la coloration obtenue avec des standards préparés de la même façon. La couleur obtenue sera jaune avec moins de 1 γ , rougeâtre de 1,5 à 2 γ et bleu-violet au dessus de 2,5. On peut estimer la quantité de brome présent avec une précision de 15-20 p. 100.

2° Pour des quantités de 3 à 18 γ :

On suit le même procédé, mais avec les quantités suivantes : 10 cm^3 de l'échantillon, 0,20 cm^3 de rouge de phénol, 2 cm^3 de borax, 0,20 d'hypochlorite N/10, 0,50 d'arsénite et 1,50 de solution acéto-acétique. On peut obtenir une précision de 10 p. 100.

3° Pour des quantités inférieures à 1 γ :

On opère sur 0,10 cm³ de l'échantillon en réduisant les quantités de tous les réactifs : on peut arriver à distinguer entre 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 γ .

L'ammonium qui peut bloquer l'hypochlorite sera éliminé en chauffant en présence de soude. L'iode, qui réagit également sur le colorant, sera éliminé par les nitrites.

Première technique proposée.

Nous avons essayé d'utiliser le rouge de phénol comme réactif du brome, mais en employant une technique se rapprochant de celle de HAHN avec la fluorescéine, c'est-à-dire que nous avons essayé de faire la réaction directement en milieu tampon à pH 5,0 en prenant également la chloramine comme oxydant. Après une étude systématique, voici la technique à laquelle nous sommes d'abord arrivé :

Réactifs :

a) Solution de rouge de phénol.

Rouge de phénol (phénolsulfonephtaléine).....	33 mg.
Soude décinormale	3 cm ³
Eau distillée Q.S.P.....	100 cm ³

1 cm³ de cette solution peut fixer théoriquement environ 300 γ de brome.

b) Solution tampon à pH 5,0.

Solution normale de soude.....	500 cm ³
Solution normale d'acide acétique.....	650 cm ³

c) Solution tampon-colorant.

Solution de rouge de phénol.....	25 cm ³
Solution tampon Q.S.P.....	500 cm ³
2 cm ³ peuvent fixer théoriquement 30 γ de brome.	

d) *Solution de chloramine N/20 (ou M/40).*

Sel de sodium de la paratoluènesulfone chloramide (P. M. = 281,6) soit 7 g. par litre. Cette solution se conserve plusieurs mois à l'obscurité.

Par dilution au dixième, on obtient la solution N/200, qui est employé dans le dosage et que l'on renouvellera quotidiennement.

e) *Solution d'hyposulfite de sodium à 25 p. 100.*

Mode opératoire :

Dans un petit bécher de 30 cm³, on mesure :

Solution contenant de 1 à 20 γ de brome sous forme de bromure	5 cm ³
Solution tampon-colorant	2 cm ³

Dans un petit tube à essai de 12/60, on mesure

Solution de chloramine N/200.....	2 cm ³
-----------------------------------	-------------------

On verse d'un seul coup le contenu du petit tube à essai dans le becher et on agite. Après 15 secondes, on bloque la réaction par 1 goutte de la solution d'hyposulfite de sodium. On transvase dans un petit tube gradué de 10 cm³, on lave le becher avec quelques gouttes d'eau distillée et on complète à 10 cm³. On mesure la coloration obtenue au photomètre de PULFRICH, au filtre spectral S. 57.

Avec ce mode opératoire, nous avons obtenu les quelques chiffres suivants exprimés en coefficient d'extinction pour une épaisseur de 20 mm.

Les témoins donnent une absorption inférieure à 0,01.

Quantité de brome en γ	Coefficient d'extinction					
5	0,165	— 0,170	— 0,177	— 0,175	— 0,175	— 0,177
7,5	0,260	— 0,260	— 0,270	— 0,262	— 0,270	— 0,260
10	0,317	— 0,317	— 0,315	— 0,320	— 0,315	— 0,317
	0,317	— 0,320	— 0,330	— 0,330		
12,5	0,430	— 0,435				
15	0,490	— 0,480				

En vérifiant la méthode sur des solutions, de titre inconnu de nous au moment du dosage, nous avons trouvé :

Théorique	2,85 par cm ³	1,66	3,47
<i>Trouvé</i>	2,80-2,82-2,85	1,68-1,67-1,69	3,3-3,3-3,3
Moyenne.....	2,82	1,68	3,3

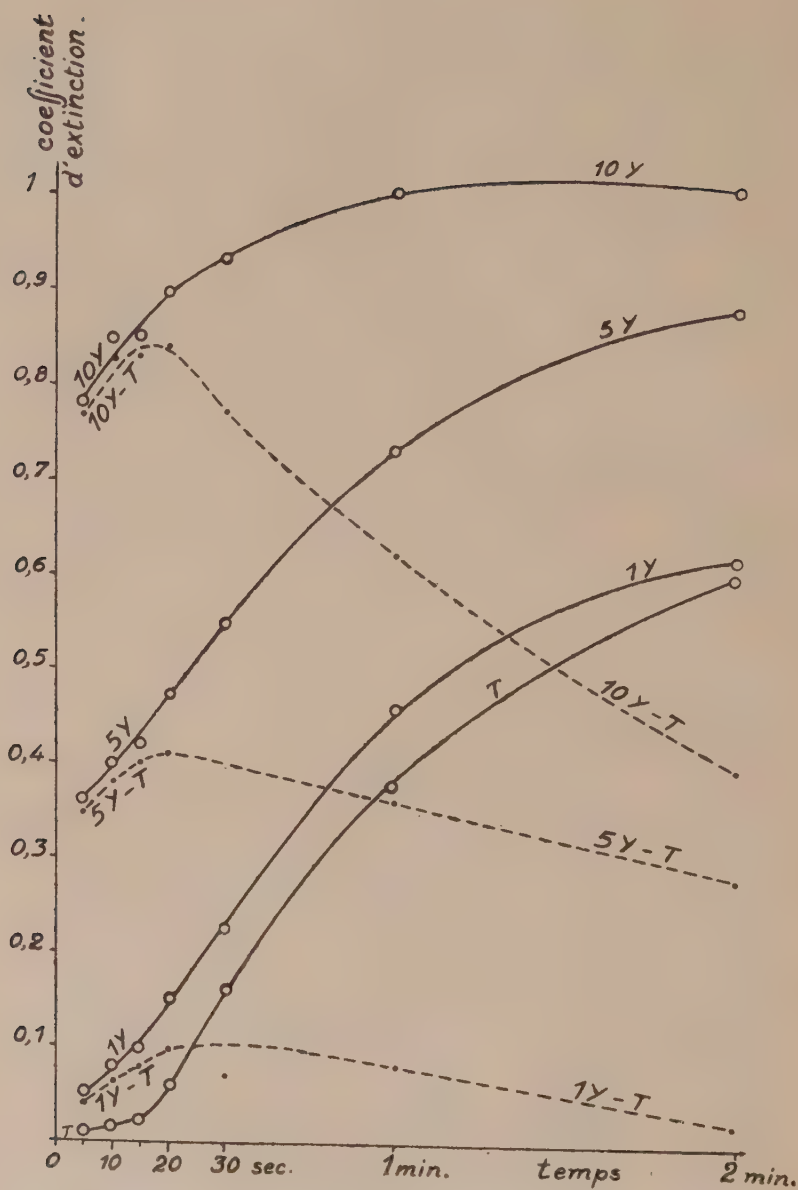
Etude systématique de la réaction colorimétrique.

Nous avons étudié de plus près cette réaction en faisant varier les différents facteurs.

Influence du temps.

Les autres facteurs (chloramine, colorant, quantité de tampon, pH) sont constants. Les chiffres correspondent au coefficient d'extinction à l'écran S 57, sous une épaisseur de 5 cm.

Temps	0	1 γ	5 γ	10 γ
5 sec..	0,00-0,02	0,045-0,050	0,37-0,36	0,78-0,77
10 sec..	0,015-0,015	0,08-0,075	0,41-0,395	0,86-0,84
15 sec..	0,02-0,03	0,09-0,10	0,42-0,42	0,87-0,83
20 sec..	0,07-0,06	0,145-0,155	0,47-0,48	0,90-0,89
30 sec..	0,155-0,17	0,22-0,23	0,555-0,55	0,94-0,93
1 min.	0,37-0,39	0,46-0,47	0,73-0,74	1,01-1,02
2 min.	0,62-0,59	0,63-0,60	0,86-0,89	1,05-0,95



Influence du temps sur la quantité de matière colorante formée.

Ces chiffres sont transcrits dans le graphique ci-contre.

On peut tirer de ces chiffres les conclusions suivantes :

Les absorptions augmentent en fonction du temps, de 5 sec. à 2 min., mais aussi bien les témoins que les autres. Si on examine la différence, on peut admettre que le dérivé bromé est totalement formé en 15 secondes ; au delà de ce temps, les témoins augmentent parallèlement. Cette coloration témoin peut être attribuée à la formation du dérivé chloré de la phénolsulfonephthaléine.

Influence de la quantité de chloramine.

Chloramine	Temps	0	1 γ	5 γ	10 γ
N/100	5 sec... .	0,015-0,02	0,09-0,095	0,42-0,45	0,85-0,84
	10 sec... .	0,115-0,12	0,195-0,20	0,56,0,55	0,92-0,92
N/400	15 sec... .	0,000-0,002	0,05-0,05	0,385-0,37	0,79-0,82
	30 sec... .	0,02-0,02	0,085-0,08	0,41-0,42	0,85-0,83
	1 min... .	0,06-0,07	0,15-0,15	0,47-0,47	0,89-0,87
N/800	1 min... .	0,005-0,012	0,055-0,06	0,36-0,36	0,80-0,80
	2 min... .	0,025-0,02	0,10-0,095	0,42-0,43	0,86-0,83
	3 min... .	0,045-0,40	0,12-0,12	0,43-0,45	0,87-0,83

On voit par ces chiffres que l'on n'a aucun intérêt à changer la quantité de chloramine ; en effet on obtient des résultats à peu près identiques soit avec 5 sec. et de la chloramine N/100, soit 15 sec. et N/200, soit 30 sec. et N/400 soit 2 min. et N/800. Le temps de 5 sec. étant difficile à mesurer avec une approximation suffisante, il convient donc de garder la chloramine N/200 et le temps de 15 sec.

Influence de la quantité de colorant.

Au lieu d'employer la solution tampon-colorant, nous avons employé 2 cm³ de la solution tampon et ajouté des quantités variables de colorant.

Colorant	0	1 γ	5 γ	10 γ
1/2 goutte	0,00-0,005	0,08-0,085	0,42-0,42	0,50-0,51 (1)
II gouttes	0,035-0,04	0,105-0,10	0,42-0,43	0,84-0,81
V gouttes	0,10-0,09	0,16-0,14	0,36-0,34	0,70-0,68

(1) Les chiffres obtenus pour 10 γ avec 1/2 goutte de colorant correspondent à la saturation du colorant par le brome en excès.

On voit par ces chiffres que des quantités trop fortes de colorant gênent la formation du dérivé bromé, comme si le brome était utilisé dans une autre réaction parasite. On a donc intérêt à n'employer que des doses de colorant qui ne représentent pas un trop grand excès par rapport aux quantités de brome que l'on se propose de doser.

Influence de la quantité de tampon.

Quantité de tampon	0	5 γ
1 cm ³	0,015-0,02	0,41-0,41
5 cm ³	0,035-0,035	0,43-0,45

La quantité de tampon semble avoir peu d'influence. Les différences observées peuvent être interprétées comme étant des apports légers de brome par le tampon.

Influence du pH.

Nous avons préparé une solution normale d'acide acétique et une solution normale d'acétate de sodium.

Par mélange de ces deux solutions on obtient une gamme de pH dans la zone qui nous intéresse. Les lectures ont été faites à pH 4,8, obtenu en s'arrangeant pour que les quantités finales de ces deux solutions, après formation du dérivé bromé, soient : 0,8 cm³ de solution normale d'acide acétique ; 1,2 cm³ de solution normale d'acétate de sodium.

Nous avons essayé différents pH. Voici les résultats que nous avons obtenus :

Acide acétique N en cm ³	Acétate de sodium N en cm ³	pH	Temps	Chloramine	0	1 γ	5 γ	10 γ
0,8	0,2	4,0	15 sec.	N/200	0,00-0,005	0,035-0,035	0,355-0,34	0,79-0,79
			30 sec.	—	0,005-0,005	0,06-0,057	0,42-0,43	0,89-0,90
			1 min.	—	0,04-0,05	0,125-0,13	0,56-0,54	1,00-0,95
0,05	1,20	5,7	15 sec.	—	0,005-0,005	0,02-0,025	0,17-0,16	0,27-0,27
			1 min.	—	0,04-0,04	0,095-0,095	0,35-0,34	0,76-0,76

On voit, d'après ce tableau, qu'un pH plus bas donne des résultats plus intéressants. Nous avons cherché quel pH serait préférable en faisant des expériences à des pH voisins de 4,0. Finalement nous avons adopté, comme pH de la réaction, le pH 4,0. Il restait à déterminer le pH le plus favorable pour faire la mesure colorimétrique. Pour cela nous avons fait une série de colorations à pH 4,0 ; puis nous les avons mélangées et avons fait des prélèvements que nous avons amené à des pH différents et complété à un même volume de 10 cm³. Voici les résultats que nous avons trouvé.

pH	0	5 γ
4,6	0,01-0,01	0,39-0,40
4,8	0,015-0,02	0,44-0,42
5,0	0,025-0,025	0,45-0,45

Nous avons donc adopté le pH de 5,0 (il n'y a aucun intérêt à prendre un pH plus élevé, car alors le dérivé chloré donne des absorptions de plus en plus fortes).

Deuxième technique.

Nous avons donc été amené à modifier notre réaction colorimétrique de la façon suivante :

A 4 cm³ d'eau contenant le bromure, on ajoute 2 cm³ d'une solution tampon à pH 4,0 constituée par le mélange de 1000 cm³ de solution d'acide acétique 2 N et 180 cm³ de soude 2 N. On ajoute 1 goutte de colorant (on peut également employer le mélange préparé à l'avance de la solution tampon et du colorant). On ajoute 2 cm³ de chloramine à un titre fixé et, après un temps déterminé, on bloque la réaction par une goutte d'hyposulfite. On ramène à pH 5,0 en ajoutant 1 cm³ de soude 2 N, complète à 10 cm³ et examine ensuite au photomètre à l'écran S 57 sous 5 cm.

Il fallait enfin fixer la concentration en chloramine et le temps le plus adéquat. Nous avons fait les dosages suivants :

Chloramine	Temps	0	5 γ
N/100	20 sec.	0,01-0,015	0,48-0,49
—	25 sec.	0,015-0,02	0,56-0,56
		0,015-0,02	0,54-0,53
—	30 sec.	0,055-0,06	0,61-0,59
N/50	15 sec.	0,07-0,07	0,62-0,63

Nous avons finalement adopté le temps de 25 secondes avec de la chloramine N/100. En effet, avec un temps de 30 secondes, la formation de dérivé chloré est déjà appréciable. D'autre part si on augmente la

concentration de chloramine, déjà avec 15 secondes, la formation du dérivé chloré est importante.

Technique plus sensible.

Nous avons essayé de doser des quantités plus petites de brome en diminuant le volume de liquide :

On mesure 1 cm³ d'une solution contenant 0,5 cm³ de solution tampon à pH 4,0 et 1/10^e de goutte de colorant. On ajoute une goutte de chloramine à une concentration déterminée et après un temps qu'il reste à fixer, on arrête la réaction par une goutte d'hyposulfite de sodium N/10. On ramène à pH 5,0 en ajoutant 0,5 cm³ de soude N. On examine ensuite au photomètre sous 5 cm. (Avec les microcuves, il suffit d'environ 1,20 cm³ pour cette épaisseur).

Une série d'expériences nous a permis de fixer la concentration en chloramine et le temps :

Chloramine	Temps	0	0,5 γ
N/20	15 sec.	0,00-0,00	0,225-0,225
—	30 sec.	0,015-0,015	0,31-0,315
—	35 sec.	0,04-0,035	0,36-0,36
—	40 sec.	0,06-0,06	0,38-0,39
—	1 min.	0,10-0,11	0,42-0,43

Nous avons finalement retenu le temps de 30 secondes. Nous n'avons pas jugé utile d'essayer une concentration en chloramine plus forte, craignant que cette chloramine, ainsi concentrée, n'agisse localement, avant d'être répandue dans toute la masse du liquide, et ne produise des perturbations amenant des résultats irréguliers.

Avec cette technique nous avons obtenu les quelques chiffres suivants :

Brome en γ	Coefficient d'extinction			
0,2	0,155	— 0,145	— 0,145	— 0,14
	0,125	— 0,12	— 0,12	— 0,15
0,4	0,245	— 0,26	— 0,28	— 0,26
	0,26	— 0,255	— 0,25	— 0,26
0,6	0,425	— 0,43	— 0,43	— 0,41
	0,39	— 0,42	— 0,41	— 0,40
0,8	0,53	— 0,52	— 0,53	— 0,55
	0,54	— 0,54	— 0,52	— 0,52

Influence des iodures. — Nous avons constaté que les iodures donnaient avec la phénolsulfonephthaléine un dérivé iodé de coloration voisine de celle du dérivé bromé, mais d'intensité moins grande. Nous avons cherché quelle perturbation pouvait amener de petites quantités de cet halogène dans notre technique colorimétrique. Nous avons trouvé les résultats suivants :

Iode en γ	Coefficient d'extinction
1	0,165-0,165
2	0,34-0,35

On voit par ces chiffres que 1 γ d'iode donne un coefficient d'extinction de l'ordre de 0,16 à 0,18, c'est-à-dire 3 à 4 fois moins grand que celui obtenu avec le même poids de brome. On peut donc admettre qu'une quantité d'iode, égale en poids à la quantité de brome à doser, amènerait une erreur par excès d'environ 25 p. 100. Si l'on était en présence d'un plus grand excès d'iode, il serait nécessaire de l'éliminer dans une opération préalable. Nous verrons qu'en

pratique, dans notre technique générale, l'iode ne nous gêne pas.

Ainsi cette méthode présente, à notre avis, un certain nombre d'avantages :

Comme les méthodes à la fluorescéine, elle présente l'avantage de s'effectuer en *milieux aqueux* et de donner des solutions colorantes *stables*. L'expérience suivante prouve la stabilité des solutions : Quatre solutions donnant respectivement des absorptions exprimées en coefficient d'extinction de 0,22 — 0,43 — 0,68 — 0,89 sont restées au laboratoire, devant une fenêtre, et ont donné, après trois mois et demi, les coefficients suivants : 0,21 — 0,44 — 0,66 — 0,89.

Cette méthode présente enfin une *sensibilité* très grande puisqu'elle permet de doser jusqu'à 0,1 γ avec une précision suffisante. L'erreur n'atteint pas 6 p. 100 pour des quantités de l'ordre de 0,8 γ ; mais elle est d'environ 20 p. 100 pour des quantités aussi faibles que 0,2 γ .

Si on compare la sensibilité des différentes méthodes à la fuchsine, à la fluorescéine et à la phénolphtaléine on obtient les résultats suivants :

Nous avons trouvé par la technique de GUILLAUMIN et MEREJKOWSKI un coefficient d'absorption de 2,0 pour 50 γ de brome examiné dans un volume de 2 cm³ et pour une épaisseur de 20 mm. Dans la méthode à la fluorescéine, nous avons trouvé, avec notre modification qui augmente la sensibilité : environ 0,40 pour 20 γ de brome examiné dans un volume de 3 cm³ et pour une épaisseur de 5 mm.

Enfin dans notre technique nous trouvons environ 0,06 pour 0,1 γ de brome examiné dans un volume de 1,60 cm³ et pour une épaisseur de 50 mm. Calculons

le coefficient d'extinction obtenu dans chaque technique pour 1 γ sous 50 mm. d'épaisseur, en gardant les volumes respectifs, nous trouvons :

	Br en γ	Volume	Epaisseur	C. E.	C.E. pour 1 γ sous 50 mm.
Méthode à la fuchsine...	50	2 cm ³	20 mm.	0,40	0,20
Méthode à la fluorescéine	50	3 cm ³	5 mm.	0,06	0,10
Méthode à la P. S. P....	0,1	1,6 cm ³	50 mm.	2,00	0,60

Si on calcule le coefficient d'extinction pour 1 γ sous 50 mm. et ramené au même volume, de 2 cm³ par exemple, on trouve les chiffres suivants :

Méthode à la fuchsine.....	0,10
Méthode à la fluorescéine.....	0,30 (1)
Méthode à la P.S.P.....	0,48

Ce tableau montre donc la plus grande sensibilité des méthodes à la phénolsulfonephtaléine.

(1) Dans un très récent article, M. TIFFENEAU [33] indique employer la méthode de HAHN en mesurant l'intensité de la coloration au photomètre de PULFRICH ; on trouve dans cet article, une courbe d'étalonnage, de laquelle on peut déduire que pour 40 γ de brome, on obtient un coefficient d'absorption de 0,45. Dans la méthode de HAHN, le volume total est de 1,25 cm³ (1 cm³ de solution + 5 gouttes des différents réactifs). En admettant que M. TIFFENEAU n'emploie que des cuves de 5 mm. d'épaisseur, cela ferait pour 1 γ sous 50 mm. en gardant le volume de 1,25 cm³ une absorption de $\frac{0,45 \times 10}{40} = 0,11$, chiffre beaucoup plus faible que celui que nous obtenons, même avec un volume de 2 cm³.

DEUXIÈME PARTIE.

MINÉRALISATION.

Comme pour l'exposé des méthodes de dosage du brome minéralisé, nous ne ferons pas ici l'histoire des différentes méthodes employées. Nous renvoyons, pour cette documentation, aux mémoires de A. DAMIENS [34], qui a fait une mise au point de la question en 1920, à ceux plus récents de Ch. O. GUILLAUMIN et B. MEREJKOWSKI [35] et de Mlle L. OLSZICKA [36], en 1935, et enfin, au mémoire très récent de Th. LEIPERT [37], en 1938.

Rappelons seulement que les différents procédés peuvent se rapporter à deux catégories bien distinctes : Dans la première, on opère par voie humide et en milieu acide ; dans la seconde, on opère par voie sèche et en milieu alcalin. Nous avons étudié une méthode de chaque catégorie, faisant choix de deux méthodes qui nous paraissaient parmi les mieux étudiées.

Parmi les méthodes de destruction de la matière organique en milieu acide, nous étudierons la méthode de Th. LEIPERT et O. WATZLAWEK [38].

Nous examinerons ensuite la méthode de A. DAMIENS [34], que nous avons choisie comme type des méthodes de minéralisation en milieu alcalin.

Enfin dans un troisième chapitre, nous exposerons la technique que nous avons été amené à mettre au point, technique basée sur les mêmes principes que la méthode de A. DAMIENS.

CHAPITRE PREMIER.

MÉTHODE DE LEIPERT ET WATZLAWEK.

Th. LEIPERT et O. WATZLAWEK [38] ont mis au point une méthode basée sur le principe suivant : la substance organique est détruite, dans un appareil fermé, par un mélange sulfo-chromique suivant une technique analogue à celle de BAUBIGNY et CHAVANNE. Les halogènes devenus libres (chlore et brome) sont reçus dans une solution de soude. Le bromure et l'hypobromite formés sont oxydés en bromate par l'acide hypochloreux. Le bromate est ensuite dosé iodométriquement.

D'après les auteurs, les avantages de cette méthode sont les suivants : la minéralisation en milieu liquide est préférable à la minéralisation sèche, car elle est plus rapide et n'exige pas de préparation préalable du matériel. La méthode d'oxydation par l'acide chromique en présence d'acide sulfurique et de sel d'argent pour le dosage du brome a déjà été grandement expérimentée en macroanalyse : c'est maintenant une méthode classique. La séparation des halogènes, point critique de toute autre méthode de dosage du brome, ne provoque ici aucune difficulté. L'iode est en effet retenu à l'état d'acide iodique, tandis que le chlore et le brome se dégagent et sont recueillis dans la lessive de soude. La présence de chlore ne dérange

point ; au contraire, elle est désirable, car le chlore donne de l'hypochlorite de soude, ce qui rend superflu d'ajouter de ce produit oxydant pour transformer tout le brome à l'état de bromate. Cette oxydation en bromate par l'hypochlorite fut d'abord employée par WESZELSKY [39] pour le dosage du brome dans les eaux minérales. Ce fut surtout VAN DER MEULEN [40] qui détermina les conditions exactes pour transformer quantitativement tout le brome en bromate. Dans une solution riche en NaCl, le brome est transformé quantitativement en bromate, si on libère l'acide hypochloreux par l'acide borique ou l'acide carbonique et si on chauffe pendant quelques instants la solution. L'excès d'hypochlorite est ensuite détruit par le formiate



Le bromate formé est dosé iodométriquement :



La vitesse de cette réaction dépend de l'acidité de la solution. La réaction est cependant quantitative, même pour de très petites quantités de bromate et une faible concentration en ions hydrogène si on ajoute à la solution un peu de molybdate d'ammonium comme catalyseur.

APPAREIL (1). — La nécessité d'une assez grande quantité de solution oxydante et d'une très grande aération, ont conduit les auteurs à construire l'appareil suivant (voir figure) :

La fermeture arrondie du vase comporte un tube à entonnoir destiné à recevoir les liquides dont on veut doser la teneur en brome. Ce tube à entonnoir est soudé concentriquement dans un tube R₁, large de 1,5

(1) Fabriqué par P. HAACK, Vienne IX, rue Garelli,

cm. et portant une embouchure sur le côté ; l'extrémité du tube fin de l'entonnoir est à environ 5 cm. au-dessus de la surface du liquide oxydant. Cette dispo-

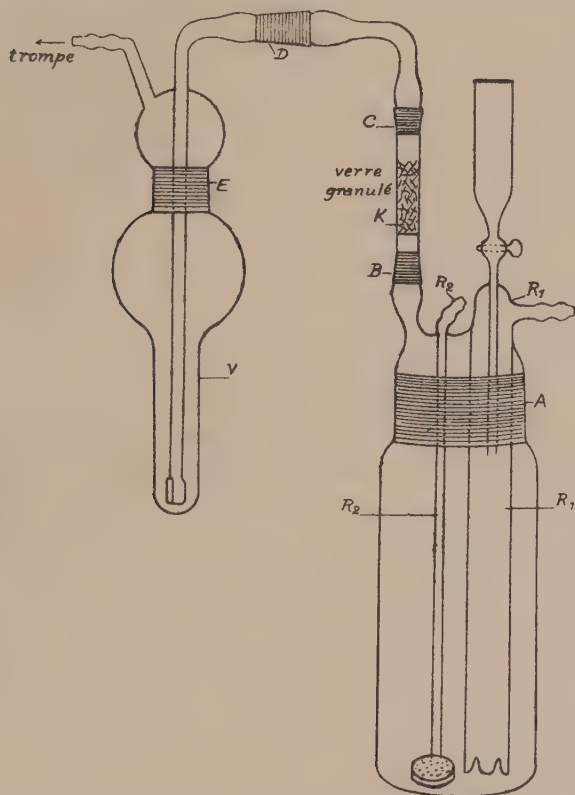


Schéma de l'appareil de Th. LEIPERT et O. WATZLAWECK.

A, B, C, D et E représentent des rodages fixés à l'aide de petits ressorts tendus entre deux crochets.

sition permet d'introduire chaque goutte du liquide à détruire dans le fond du vase et de forcer ainsi la goutte à traverser toute la couche sulfochromique ; de cette façon, l'iode et la vapeur d'eau sont rigou-

reusement retenus au sein du liquide. Un deuxième tube de verre R₂ portant un disque poreux G2 est destiné à donner une aération très poussée. Un tube de verre K, long d'environ 9 cm. sur lequel est soudé un disque de verre poreux G3, est destiné à maintenir une couche d'environ 2 cm. d'épaisseur de verre granulé que l'on arrose d'acide sulfurique légèrement dilué : ce dispositif sert à retenir le chlorure de chromyle qui se forme au cours de la destruction. Si on peut éviter complètement la formation de chlorure de chromyle lorsque l'on chauffe du chlorure de sodium avec le mélange sulfo-chromique en présence de sulfate d'argent, il n'en est plus de même lorsque l'on fait arriver la solution de NaCl goutte à goutte, en même temps qu'un assez grand courant d'air, d'où la nécessité de ce verre granulé imprégné d'acide sulfurique au tiers. Il est d'autre part à noter que le courant de gaz chaud concentre peu à peu cet acide dilué, ce qui rend plus difficile une retenue de brome sur les billes de verre. Les auteurs n'ont d'ailleurs jamais constaté de traces de brome à cet endroit à la fin d'un dosage. Le vase V, destiné à capter les gaz, comporte un disque en verre poreux G 2 comme distributeur ; sa capacité dans la partie étroite est d'environ 10 cm³. Ce vase est en relation, d'un côté, avec le vase où se produit la destruction et, de l'autre, avec une trompe à eau. Le courant d'air, ainsi aspiré dans l'appareil, passe au préalable dans un flacon contenant de la lessive de soude : l'air passe ensuite dans un tube en T dont les deux branches sont réunies, à l'aide de tuyaux de caoutchouc, respectivement aux tubes R₁ et R₂. Le vase, contenant le mélange sulfo-chromique, est plongé, jusqu'au niveau du liquide, dans un bain d'huile de paraffine contenu dans un

bécher de façon à pouvoir surveiller l'intérieur du vase.

RÉACTIFS. — Un examen attentif de tous les réactifs est nécessaire, car même les produits purs sont susceptibles de contenir du brome.

Acide chromique. — On dissout 250 g. d'acide chromique dans 150 cm³ d'eau distillée et, par aspiration, on fait passer un vif courant d'air, lavé sur de la lessive de soude.

$$1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ g. de CrO}_3$$

Acide sulfurique-sulfate d'argent. — Dans un ballon de Kjeldahl de 2 litres, on dissout 20 g. de sulfate d'argent dans un litre d'acide sulfurique concentré, on ajoute 3 cm³ de la solution d'acide chromique et on chauffe au bain d'huile à 120-130°, pendant 2 heures, en aérant fortement comme ci-dessus.

Acide borique cristallisé.

Chlorure de sodium. — On traite la solution saturée par de l'acide chlorhydrique ; le sel qui cristallise est recueilli sur un filtre de Gooch, lavé à l'eau distillée, séché, et pulvérisé. Des traces d'acides n'ont aucun inconvénient.

Solution d'hypochlorite. — Elle est employée seulement pour contrôler la pureté des réactifs ; mais n'est pas employée dans les analyses courantes. Dans une solution de 12 g. de NaOH dans 100 cm³ d'eau distillée, on fait arriver 7 g. de chlore (provenant soit d'une bouteille en acier, soit de l'action du permanganate sur HCl, mais non du chlorure de chaux). Le titre peut se conserver pendant 2 mois.

Solution normale de soude : préparée à partir du sodium.

Formiate d'ammonium : solution à 10 p. 100.

Molybdate d'ammonium : solution à 5 p. 100.

DOSAGE DU BROME DANS LA SOLUTION DE NaCl. — L'emploi d'une grande quantité de NaCl fait exiger une grande pureté de ce corps : on dissout 5 g. de NaCl dans 25 cm³ d'eau, ajoute 0,5 cm³ de solution d'hypochlorite et 1 g. d'acide borique. On maintient 10 minutes au B. M. bouillant. On ajoute ensuite 2 cm³ de solution de formiate, fait bouillir pendant 5 minutes en chauffant sur une toile métallique, refroidit, ajoute quelques cristaux de KI, de l'empois d'amidon, 1 goutte de la solution de molybdate et enfin 5 cm³ de HCl 2 N et titre l'iode dégagé par de l'hyposulfite. Le sel commun purifié contient toujours des traces de brome, traces qui ne dépassent pas 2-3 γ de Br pour 5 g. de NaCl, quantité négligeable pour la méthode.

TECHNIQUE. — Pour l'analyse du sang, on met dans le vase à destruction, 100 cm³ d'acide sulfurique-sulfate d'argent, on chauffe doucement au bain d'eau et y ajoute 8-10 cm³ de la solution d'acide chromique. Après dissolution de ce dernier, on humecte la fermeture du vase avec de l'acide sulfurique, le ferme et le plonge dans le bain d'huile préalablement chauffé à 100°. Sur le verre granulé on met 0,2 cm³ = V à VI gouttes d'acide sulfurique au 1/3. On monte complètement l'appareil : on met dans le vase V 5 cm³ de soude normale et 5 cm³ d'eau distillée. D'autre part on relie R₁ et R₂ au flacon laveur et commence l'aspiration à l'aide de la trompe. Le robinet étant fermé, on aspire environ deux bulles par seconde : l'air passera évidemment par le trajet de moindre résistance, c'est-à-dire par R₁. On met dans

l'entonnoir 5 cm³ de sang que l'on hémolyse avec 5 cm³ d'eau. On règle l'écoulement du sang, ainsi dilué, de façon que le CO₂ formé puisse être facilement aspiré par la trompe et qu'il ne produise pas de surpression dans l'appareil. L'écoulement du sang demande environ 20 minutes. On lave l'entonnoir une fois avec un peu d'eau, on flagelle d'un courant d'air et lave une seconde fois avec 5 cm³ d'eau contenant 0,5 cm³ de solution saturée de NaCl ; on diminue à ce moment, la vitesse du gaz, de façon à éviter l'entraînement de chlorure de chromyle ; on reprend ensuite la vitesse initiale et, à l'aide d'une pince à vis, on diminue l'arrivée d'air dans R₁, afin que l'air passe par R₂. On règle la pince de façon qu'il passe dans R₁ environ une bulle toutes les 3 secondes. Toutes ces additions de liquides demandent environ une demi-heure. Pendant la seconde demi-heure, on augmente peu à peu la température du bain d'huile de façon à atteindre doucement 130° —, température que l'on maintient pendant une demi-heure, soit en tout 1 heure et demie.

Pour le lait, on procède de la même façon que pour le sang.

Pour l'urine, on emploie 5 cm³ de liquide, qui exigent 5 cm³ de la solution d'acide chromique. Il est inutile d'ajouter du NaCl. On fera deux lavages avec de l'eau.

Pour le dosage du brome dans la solution alcaline, il est inutile d'ajouter de l'hypochlorite, parce que le chlorure, contenu dans les liquides biologiques, et le chlorure, ajouté pour laver le tube à entonnoir, fournissent un excès d'hypochlorite. On pèse 0,5 g. de NaCl et 1 g. d'acide borique que l'on ajoute directement dans le vase et porte au B. M. bouillant pendant

10 minutes ; on transvase dans un Erlenmeyer de 50 cm³, rince avec un peu d'eau, ajoute 2 cm³ de la solution de formiate et traite comme pour l'essai de NaCl ci-dessus ; on acidule avec 3 cm³ d'HCl 2 N. Suivant les cas, les auteurs utilisent de l'hyposulfite N/50 ou N/250.

Des essais avec des solutions pures de bromure ont donné aux auteurs les résultats suivants :

Calculé	5 γ	10 γ	25 γ	3000 γ	5000 γ
Trouvé ..	5,2	9,2	23,9	1989	4988

Vérification de la méthode.

Lorsque nous avons voulu employer cette méthode, nous nous sommes heurtés aussitôt à la question de la pureté des réactifs. Même en employant l'acide sulfurique et l'acide chromique Poulenc, de qualité R. P., et en leur faisant subir les purifications indiquées par Th. LEIPERT et O. WATZLAWEK, nous avons toujours trouvé un dégagement d'iode correspondant à 0,05 à 0,10 d'hyposulfite N/100, soit approximativement 6 à 12 γ de brome, pouvoir oxydant que nous avons vérifié comme ne venant pas de la soude ou des réactifs employés après la minéralisation, car un témoin, fait avec la soude traité par de l'hypochlorite récent, suivant la technique des auteurs, nous a donné moins de 0,02 d'hyposulfite N/100. Cette impureté est vraisemblablement du brome car elle donne en outre les colorations avec la phénolsulfonephtaléine.

D'autre part, les liquides provenant de plusieurs

opérations, concentrés et repassés dans l'appareil, donnent, soit un dégagement d'iode soit une coloration avec la phénolsulfonephtaléine, correspondant à peu près à la somme des résultats obtenus avec chaque liquide primitif.

Nous avons donc essayé de purifier nos deux acides par des procédés autres que ceux indiqués par les auteurs.

1^{re} essai. — En faisant le mélange de l'acide sulfurique-sulfate d'argent et d'acide chromique, chauffant le tout à 130° et ajoutant peu à peu une certaine quantité de NaCl pour produire un dégagement de chlore destiné à chasser le brome. Ce procédé nécessite un chauffage trop prolongée, ce qui produit une forte réduction de l'acide chromique, réduction qui se poursuit d'ailleurs ensuite, après le refroidissement ; nous avons ainsi un réactif dont une grande partie de l'acide chromique était réduit.

2^e essai. — Essai de purification de l'acide chromique seul. L'acide chromique seul ne déplace pas le chlore des chlorures ; pour obtenir un dégagement de chlore il faut acidifier par un acide fort. Dans l'appareil de Th. LEIPERT et O. WATZLAWEK, nous avons mis la solution concentrée d'acide chromique avec 1/10 d'acide sulfurique pur et nous avons fait arriver une solution de NaCl en même temps que nous aérions de la même façon que dans le dosage du brome. Pour éviter ensuite la cristallisation de l'acide chromique, nous le versions encore chaud dans le mélange acide sulfurique-sulfate d'argent.

3^e essai. — Purification de l'acide chromique en faisant traverser la solution par un courant de chlore provenant de l'action de l'acide chlorhydrique sur de l'hypochlorite de soude pur.

Ces divers essais n'ont donné aucun résultat encourageant. Nous avons donc été amené à purifier extemporanément nos réactifs en employant la technique suivante :

On met dans l'appareil les deux réactifs : acide sulfurique-sulfate d'argent et la solution d'acide chromique ; on porte à 130° et on fait arriver goutte à goutte 2 cm^3 d'eau contenant IV gouttes de solution saturée de NaCl ; on aère pendant une demi-heure, puis on fait arriver à nouveau 1 cm^3 d'eau et II gouttes de solution saturée de NaCl, et aère encore pendant une demi-heure. On change alors la soude, on laisse refroidir à 100° et continue le dosage normal. Dans ces conditions on obtient des témoins dont le pouvoir oxydant est inférieur à $0,02\text{ cm}^3$, exprimé en hyposulfite N/100.

Ayant ainsi réussi, non sans peine, à obtenir des témoins à peu près nuls, nous avons tenu à vérifier la deuxième partie de l'analyse, c'est-à-dire, la transformation intégrale en bromate et le dosage de ce dernier par déplacement de l'iode.

1° En partant de 100 γ de brome sous forme de KBr, traités suivant la technique indiquée par LEIPERT et WATZLAWECK, en employant comme oxydant une solution d'hypochlorite préparée récemment, nous avons obtenus les résultats suivants exprimés en cm^3 de solution centinormale d'hyposulfite de sodium.

0,79 — 0,79 — 0,79 — 0,78 — 0,78 — 0,79

Le chiffre théorique serait de 0,80 (1).

2° Dosage direct sur 100 γ de brome sous forme de bromate :

0,80 — 0,80 — 0,81 — 0,80

(1) Le chiffre théorique correspondant à 100 γ de Br est $0,75\text{ cm}^3$ mais nous avons une solution d'hyposulfite de titre trop faible.

3° Comme 1°, mais en mettant le brome sous forme de bromate :

0,82 — 0,81 — 0,81 — 0,80

4° Témoins sans brome : 0 — 0,01.

5° Vérification de la pureté de NaCl :

Sur 5 g. : 0,05 — 0,05 — 0,06.

Nous avons alors abordé le dosage complet, en faisant la purification extemporanée des réactifs : nous avons obtenu les résultats suivants exprimés en cm³ de solution d'hyposulfite N/100 (compte tenu de la correction due au témoin, et qui est de 0,02).

Brome mis dans l'appareil	Trouvé	Théorique
100 γ	0,76 cm ³	0,80 cm ³
50 γ	0,39 cm ³	0,40 cm ³
30 γ	0,25 cm ³	0,24 cm ³
20 γ	0,17 cm ³	0,13 cm ³

Dosage sur des solutions inconnues :

20 γ	18,2 γ
31 γ	28,6 γ
45-43 γ	38 γ
50 γ	43 γ

Critique de la méthode.

Ainsi les essais de contrôle de la méthode de Th. LEIPERT et O. WATZLAWECK nous ont donné des résultats assez intéressants. Cependant cette méthode peut être critiquée sur plusieurs points :

1° *Pureté des réactifs.* — Comme nous l'avons indiqué, nous avons rencontré de grandes difficultés

pour obtenir des témoins à peu près nuls, et ce, en recourant à un procédé long et pénible. Peut-être les auteurs avaient-ils à leur disposition des réactifs fournis par d'autres fabricants, réactifs se purifiant plus facilement que les nôtres. Cependant nous avons essayé de l'acide sulfurique et de l'acide chromique de la firme Schering-Kahlbaum sans avoir des résultats plus encourageants.

2° *Précision du virage de l'empois d'amidon.* — Quel que soit l'empois d'amidon que nous ayons employé, nous avons toujours hésité pour apprécier la fin du dosage, hésitation portant sur quelques centièmes de cm^3 d'hyposulfite N/100. En effet, dans un tel milieu, l'amidon ne vire pas directement du bleu à l'incolore, mais passe par une série de teintes brunes et par suite il est difficile de savoir où s'arrêter. Nous avons donc dû opérer par comparaison.

3° *Sensibilité de la méthode au bromate.* — Etant donné l'imprécision du virage de l'empois d'amidon, il nous semble difficile d'employer des solutions d'hyposulfite plus diluées que N/100 (en employant évidemment une microburette faisant le centième de cm^3) ; par conséquent, si l'on veut une précision encore acceptable, il ne faut pas vouloir doser des quantités de brome inférieures à 20 γ (ce qui correspond à 0,15 cm^3 d'hyposulfite N/100).

4° *Spécificité de la méthode au bromate.* — Cette technique volumétrique, qui présente certains avantages sur les techniques colorimétriques, a cependant l'inconvénient de ne pas être spécifique. En réalité, on ne dose pas du brome mais un pouvoir oxydant. Il convient cependant de remarquer que les auteurs ont pris soin d'éliminer tous les produits chlorés oxy-

dants et d'empêcher l'entraînement du chrome ; nous avons d'ailleurs vérifié nous-même qu'il ne passait pas de chrome de la façon suivante : nous avons fait une opération témoin dans l'appareil de Th. LEIPERT et O. WATZLAWECK en remplaçant la solution alcaline par de l'eau bidistillée. Après la fin de l'opération, cette solution est évaporée à sec ; le résidu est ensuite repris, suivant la technique de D. BRARD [41] par 5 cm³ d'acide sulfurique pur et chauffé jusqu'à émissions de vapeurs blanches. Après refroidissement, on verse dans 40 cm³ d'eau ; on ajoute I à II gouttes de NO₃Ag à 1 p. cent ; on porte à l'ébullition, puis le mélange est retiré du feu ; on ajoute quelques décigrammes (0,20) de persulfate d'ammonium dissous dans 10 cm³ d'eau distillée ; on laisse l'oxydation se poursuivre pendant quelques minutes (5 minutes). On porte ensuite à l'ébullition pour décomposer le persulfate pendant 10 minutes. Quelques cm³ de cette solution, traités par I goutte de solution à 0,20 p. 100 de diphénylcarbazine dans l'alcool à 95° n'ont donné aucune coloration.

Essai de modification de la méthode.

Ainsi, dans cette méthode, si l'on excepte la question de la pureté des réactifs, il nous semble difficile de critiquer le mode de minéralisation. Les auteurs ont en effet réussi à appliquer, à l'échelle microanalytique, la technique classique de BAUBIGNY et CHAVANNES. Leur appareil, fort ingénieux et très bien étudié, permet un entraînement excellent du brome. La terminaison du dosage par la méthode au bromate semble au contraire, beaucoup plus facilement critiquable, principalement quant à sa spéci-

ficité et surtout sa sensibilité, qui n'est pas assez grande. C'est pourquoi, nous avons essayé d'employer la méthode de ces auteurs, mais en terminant par notre technique colorimétrique, qui est beaucoup plus spécifique et plus sensible. Pour cela, il faut avoir tout le brome sous forme de bromure ; or, lorsque l'on retire la solution alcaline de l'appareil, le brome s'y trouve, à la fois sous forme de bromure, hypobromite et bromate. Deux solutions se présentent donc à nous ; ou bien, après la minéralisation, réduire les composés oxygénés du brome en bromure, ou bien empêcher la formation de ses composés dans la solution alcaline, au cours de la minéralisation.

1° *Réduction des bromates par la chaleur.* — Cette technique est assez dangereuse, car, d'une part, il faut chauffer suffisamment pour obtenir la réduction, et d'autre part, si on chauffe trop, on risque les pertes de brome par volatilisation.

2° *Empêchement de la formation de composés oxygénés du brome* dans la solution alcaline, à l'aide de corps réducteurs. Nous avons d'abord essayé l'urée, qui ne gêne pas la réaction à la fluorescéine, mais nous l'avons abandonné, car l'urée gêne la réaction à la phénolsulfonephtaléine. Nous avons essayé l'ammoniaque et l'hydrazine. Ces deux corps présentent l'inconvénient de donner des fumées blanches abondantes dans l'appareil, fumées dues aux sels halogénés de ces corps, et qui, par conséquent, risquent d'entraîner du brome. D'autre part, la solution alcaline évaporée ensuite au B. M. pour éliminer les bases volatiles, garde cependant un léger pouvoir réducteur qui gêne la réaction colorée.

Nous avons réussi à terminer ce dosage par notre technique colorimétrique, en opérant le captage du

brome dans la solution alcaline en présence d'acide arsénieux et en isolant ensuite le brome sous forme d'un précipité d'halogénure d'argent. On termine ensuite le dosage comme par la technique à l'argent que nous indiquons dans le chapitre III. Ce mode opératoire a nécessité deux contrôles :

1° La solution alcaline provenant de la minéralisation est un liquide très riche en chlorures, puisque l'on met dans l'appareil 0,50 cm³ de solution saturée de NaCl, sans compter le chlore amené par le liquide biologique. D'autre part, notre technique exige un précipité d'halogénure d'argent correspondant à environ 1 cm³ N/10. Il fallut donc vérifier que dans un milieu contenant de petites quantités de brome et un très fort excès de chlorures, en ajoutant, à ce milieu, seulement 1 cm³ de solution décimale de nitrate d'argent, tout le brome se trouvait dans le précipité. Si l'on opère directement en milieu d'acide, l'argent est capté immédiatement par le chlorure en excès et le brome est très mal et très irrégulièrement entraîné : au contraire, si on opère l'addition de tous les réactifs en présence d'ammoniaque et si l'on acidifie ensuite petit à petit, par l'acide nitrique, dans ces conditions, même en présence de très fortes quantités de chlorures, on retrouve tout le brome dans le précipité.

Nous avons ensuite vérifié que, si en plus de chlorures, on ajoutait au milieu de l'acide arsénieux, le résultat ne changeait pas.

2° Nous avons vérifié qu'en captant les gaz provenant de la destruction sulfo-chromique, dans de la soude contenant de l'acide arsénieux, les produits oxydants étaient immédiatement réduits et qu'à la fin du dosage on trouvait les halogènes, uniquement sous forme de bromure et chlorure.

Nous avons donc adopté la technique suivante :

On remplace les 5 cm³ de soude normale et 5 cm³ d'eau, par 10 cm³ d'une solution contenant par litre 100 cm³ de lessive de soude et 25 g. d'As₂O₃. Après la minéralisation, ce liquide est versé dans un tube conique de centrifugeur, puis on rince avec quelques cm³ d'eau (2 cm³ + 1 cm³), ajoute 1 cm³ d'ammoniaque, 1 cm³ de solution décinormale de nitrate d'argent, puis goutte à goutte 2,5 cm³ d'acide nitrique pur. Le précipité d'halogénures est ensuite centrifugé, puis traité comme dans notre technique personnelle.

Voici quelques résultats obtenus, par cette technique modifiée, et comparés avec ceux obtenus par notre technique personnelle que nous exposons dans le chapitre III. Les résultats sont exprimés en γ par cm³ de sérum ou de sang total.

Echantillons	Méthode de Th. LEIPERT et O. WATZLAWECK, avec les modifications que nous y avons apportées	Technique personnelle
<i>Sérum sanguin :</i>		
La.....	1,40 γ	1,45 γ
Ur.....	1,9 —	1,7 —
Ol.....	2,7 —	3,0 —
Ro.....	2,2 —	2,0 —
<i>Sang total.</i>		
Ha.....	1,8 —	2,0 —
Am.....	2,1 —	2,4 —
Se.....	1,9 —	2,4 —
Gr.....	2,1 —	2,5 —

On voit, d'après ces quelques exemples, que les concordances des résultats obtenus par les deux méthodes, dont les techniques de minéralisation sont si différentes, sont satisfaisantes.

Il nous paraît intéressant de remarquer que la méthode de Th. LEIPERT et O. WATZLAWECK, avec les modifications que nous lui avons fait subir dans la dernière phase du dosage, permet de supposer avec une très grande probabilité que c'est bien du brome que nous dosons. En effet nous dosons un corps qui présente les propriétés suivantes :

1° Il est volatil ou entraînable par un courant d'air, lorsque l'on traite ses combinaisons par le mélange sulfo-chromique-sulfate d'argent à chaud.

2° Il est fixé par la soude.

3° Il est précipité par le nitrate d'argent (ou entraînable par le précipité de chlorure d'argent).

4° Il donne avec la phénolsulfonephthaléine une coloration identique à celle que donnent les composés bromés.

Cet ensemble de propriétés apporte, croyons-nous, une certitude complète, donc l'identification du brome dans les produits biologiques.

Ainsi cette méthode de Th. LEIPERT et O. WATZLAWECK nous a donné de bons résultats, aussi bien dans sa forme originelle qu'avec les modifications que nous y avons apportées, cependant nous n'avons pas cru devoir la retenir autrement que pour contrôler notre technique personnelle ; en effet elle ne répond pas au but que nous nous sommes donné ; elle nécessite un appareillage spécial, elle nous a donné des difficultés pour la purification des réactifs ; enfin sa sensibilité n'est pas assez grande.

CHAPITRE II.

MÉTHODE DE A. DAMIENS.

A. DAMIENS [42], a mis au point une technique qui permet de retrouver, à 10 γ près environ, dans 5 g. de matière sèche, 60 γ de brome.

Le principe en est le suivant :

1° destruction en présence de carbonates alcalins par le nitrate de potassium.

2° dissolution des sels, acidification par l'acide nitrique et précipitation par le nitrate d'argent ;

3° réduction du précipité argentique par le zinc, qui libère l'acide bromhydrique.

4° dosage colorimétrique avec le réactif de DENIGÈS-CHELLE.

Voici la technique telle quelle est exposée, par Mlle C. CHATAGNON [43], élève de A. DAMIENS, dans sa thèse, pour le cas du sang : Pour les organes, ou pour d'autres liquides biologiques, il n'y a que de légères modifications de détail.

On opère, selon les cas, sur des quantités de sang allant de 5 à 30 cm³. Le sang est versé dans une capsule d'argent contenant les proportions suivantes de sels alcalins : 8 grammes de nitrate de potassium et 17 grammes de carbonate de sodium anhydre pour 5 cm³ de sang. On incorpore la poudre au sang et on rend très homogène la masse pâteuse qui, à la fin de l'opération, devient pulvérulente. On la porte direc-

tement au four à moufle. Les précautions concernant la température du moufle doivent être strictement observées. La masse se boursoffle puis devient poreuse ; lorsqu'elle est blanc jaunâtre ou rosée, l'opération est terminée. La solubilité dans l'eau distillée bouillante en est très grande. La quantité d'eau qui doit intervenir est en rapport avec la quantité de la prise d'essai. On utilise pour la recueillir un vase à précipiter de 800 à 1000 cm³.

ISOLEMENT DU BROME ET DU CHLORE. — Ces deux éléments se trouvent en présence de très grandes quantités de sels étrangers ; la caractérisation du brome étant difficile dans ces conditions, il faut les éliminer.

La solution précédente est neutralisée par de l'acide nitrique exempt de brome, introduit goutte à goutte au moyen d'un entonnoir à long tube dont l'extrémité plonge au fond du vase à précipiter contenant le liquide. Le dégagement du gaz carbonique étant très lent, on évite ainsi les projections de liquide que produirait une vive effervescence. Le vase à précipiter est du reste recouvert d'une plaque de verre. Cette opération est longue, de durée variable selon la masse saline utilisée : Pour 200 à 400 cm³, elle demande environ 24 heures pour être parfaitement conduite. La neutralité étant obtenue, on ajoute un excès de 2 à 3 cm³ d'acide nitrique.

La solution ainsi acidifiée doit être incolore et limpide. Si elle ne l'est pas, on la filtre. On en précipite ensuite les halogènes par une solution décimormale de nitrate d'argent employée en excès. On porte le liquide à l'ébullition pendant 10 minutes, puis au bain-marie pendant 3 heures, pour rassembler le précipité. On abandonne au refroidissement pendant une nuit, on filtre la liqueur surnageante sur un filtre

sans cendres, en ayant soin d'entraîner le moins possible de précipité, celui-ci devant rester dans le vase où on l'a formé. La liqueur filtrée est recueillie. Le précipité argentique est dense et massif, lorsque la quantité de chlorure est prédominante ; il se montre plus grenu, comme poussiéreux, lorsque les bromures sont en forte proportion. Il est lavé par décantation à 5 ou 6 reprises avec 10 cm³ d'eau distillée dans chaque opération. Les eaux de lavage sont jointes à la liqueur filtrée. Il faut obtenir la disparition de toute acidité des eaux de lavage. Toutes les manipulations où intervient le précipité argentique, sont effectuées dans une chambre noire, à la lumière diffuse.

Lorsque le lavage est terminé, on est donc en présence :

1° d'un précipité d'halogénures d'argent, qui sera utilisé pour le dosage du brome.

2° d'un liquide dans lequel on dosera l'excès d'argent, ce qui permettra de connaître, par différence, la quantité de chlore intervenue à l'origine de l'opération.

DOSAGE DU BROME. — Il est réalisé à partir du précipité argentique qui se trouve dans le vase où il a été formé.

On y ajoute quelques parcelles qui ont pu être recueillies sur le filtre, en les entraînant au moyen d'un jet très fin d'eau distillée utilisant seulement environ 3 à 4 centimètres cubes.

On dépose un fragment de zinc et 3 gouttes d'acide sulfurique pur ; les sels d'argent sont réduits, le métal est libéré et les halogènes entrent en solution à l'état d'acides et de sels de zinc. Le liquide est filtré sur un très petit filtre de papier et reçu dans un tube

spécial bouché à l'émeri. Le précipité d'argent réduit est lavé par quelques centimètres cubes d'eau distillée, les eaux de lavage sont réunies à la solution dans le tube et le volume du liquide est finalement amené à 10 cm³. C'est sur ce liquide ou sur une fraction de celui-ci, si l'on suppose une forte concentration en brome, que l'on cherche cet halogène par la méthode de DENIGÈS et CHELLE.

Cette méthode a donné d'excellents résultats entre les mains de son auteur ; elle a également permis de nombreuses applications dans les travaux de Mlle BLAIGNAN [44] et de Mlle CHATAGNON [43].

Cependant le but précis que nous avons défini au début de ce travail, surtout en ce qui concerne la sensibilité, ne nous a pas permis d'utiliser cette technique telle que ; mais elle nous a servi de base pour l'établissement de la technique personnelle que nous exposons dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III.

TECHNIQUE PERSONNELLE.

Ayant une méthode colorimétrique plus sensible que la réaction de DENIGÈS-CHELLE, nous avons essayé d'adapter la méthode de A. DAMIENS pour des quantités plus petites, en conservant le même principe. D'autre part nous avons essayé d'obtenir une destruction en milieu humide, ce qui permet plus facilement des dosages en série.

Nous exposerons d'abord la technique telle que nous l'avons mise au point et nous reprendrons ensuite chaque point pour expliquer comment nous sommes arrivé au mode opératoire indiqué et pour justifier notre technique.

PRINCIPE. — Destruction de la matière organique soit par calcination en présence de magnésie, soit par digestion alcaline suivie d'une attaque acide en milieu nitrique concentré, isolement du brome sous forme d'halogénure d'argent, élimination de l'argent par le zinc et dosage du brome, en le déplaçant par la chloramine et le fixant sur la phénolsulfonephthaléine pour former la tétrabromophénolsulfonephthaléine dont on estime colorimétriquement la quantité formée.

RÉACTIFS. — 1° Magnésie pure (pour la méthode par calcination) ;

2° Lessive de soude (pour la méthode par voie humide) ;

3° Solution décimale d'acide chlorhydrique ou de chlorure de sodium.

4° Ammoniaque pure ;

5° Solution de nitrate d'argent à 50 p. 100 ;

6° Acide nitrique pur ;

7° Alcool à 96° ;

8° Acide acétique pur saturé d'acétate d'argent ;

9° Solution saturée de chlorure de sodium, diluée au quart ;

10° Zinc pur en aiguilles ;

11° Solution de rouge de phénol :

Rouge de phénol (phénolsulfonephthaléine).	0,033 g.
Solution décimale de soude.....	3 cm ³
Eau distillée Q. S. P.....	100 cm ³

1 cm³ de cette solution peut fixer théoriquement environ 300 γ de brome.

12° Solution tampon acéto-acétique à pH 4,0 :

Solution d'acide acétique 2 N.....	1000 cm ³
Solution de soude 2 N.....	180 cm ³

13° Solution tampon colorant :

Solution tampon à pH 4,0.....	125 cm ³
Solution de rouge de phénol.....	1,25 cm ³
Eau distillée Q. S. P.....	150 cm ³

14° Solution de chloramine T N/20 (ou M/40).

Sel de sodium de la paratoluène sulfone chloramide (P. M. = 281,6).

Soit 7 g. par litre.

15° Solution décimale d'hyposulfite de sodium.

16° Solution normale de soude.

17° Solution de bromure de potassium à 1,49 g. par litre.

1 cm³ contient 1 mg. de brome. Par des dilutions successives, permet de faire une gamme.

APPAREILS. — Four à moufle { pour la méthode
et plaque chauffante { par calcination

Un bon centrifugeur faisant 4.500 ou mieux 6.000 tours-minute.

Un bain-marie

Tubes de centrifugeurs coniques, de 20 cm³ de capacité, en pyrex.

Pipettes

Compte-gouttes

Agitateurs (1)

Tubes de 12/60 par exemple

Un photomètre de PULFRICH (non obligatoire) : permet d'éviter la préparation d'une gamme.

Technique pour le dosage dans le sang.

1° CALCINATION EN PRÉSENCE DE MAGNÉSIE. — Dans une petite capsule, on mesure 1 cm³ de sang dilué au quart et on ajoute, en la répartissant aussi uniformément que possible, 0,50 g. de magnésie. (Pour des dosages en série, nous utilisons une petite mesure dont la contenance correspond à ce poids). La magnésie absorbe le liquide et il n'est pas besoin de triturer avec un agitateur (ce qui nécessiterait ensuite le nettoyage de cet instrument et compliquerait inutilement la manipulation). La capsule est portée sur une plaque chauffante pendant 5 à 10 minutes, puis au four à moufle électrique, dont nous maintenons la température à 480-500° en contrôlant constamment cette température à l'aide d'un pyromètre. La masse noircit, puis présente un léger phénomène d'incandescence qui disparaît ensuite. Après 5 minutes dans

(1) Pour éviter l'adhérence possible de particules d'halogénures d'argent, ces agitateurs doivent avoir l'extrémité bien lisse. Sinon, il conviendra de les passer dans la flamme d'un bec Bunsen.

le four, on retire la capsule qui contient une masse blanche : on laisse refroidir 5 minutes, puis on entraîne la plus grande partie de la poudre à l'aide d'un agitateur dans le tube du centrifugeur ; le reste de la poudre est entraîné à l'aide de 3, 2 et 1 cm³ d'eau distillée. On ajoute alors dans le tube, 0,75 cm³ d'acide chlorhydrique N/10 (de façon à avoir un précipité argentique plus important, correspondant à environ 1 cm³ de solution N/10), 1 cm³ d'ammoniaque destinée à empêcher la précipitation de l'argent en milieu alcalin et 3 gouttes de la solution de nitrate d'argent à 50 p. 100. On mélange intimement à l'aide de l'agitateur, puis on acidifie par l'acide nitrique en ajoutant 7 à 8 cm³ d'acide par portions de 1 cm³ et en agitant après chaque addition. On refroidit le tube en le plongeant quelques minutes dans l'eau. On lave ensuite l'agitateur et le bord supérieur du tube à l'aide de 2 cm³ d'alcool. On centrifuge, rejette le liquide par retournement du tube et lave ce dernier en le remplissant d'eau distillée et le vidant sans mettre en suspension le précipité.

1 BIS : MINÉRALISATION EN MILIEU HUMIDE. — a) *digestion alcaline*. — Dans le tube du centrifugeur, on mesure 1 cm³ de sang dilué au quart et 0,5 cm³ de lessive de soude. On porte au bain-marie pendant 10 minutes. On ajoute ensuite 0,75 cm³ d'acide chlorhydrique N/10, 1 cm³ d'ammoniaque, 3 gouttes de solution de nitrate d'argent à 50 p. 100 et 10 cm³ d'acide nitrique.

b) *Attaque acide*. — On porte à nouveau le tube au bain-marie pendant 30 minutes. On lave ensuite l'agitateur et le bord supérieur du tube à l'aide de 2 cm³ d'eau distillée et on centrifuge. On décante et lave le tube comme ci-dessus.

2° PURIFICATION DU PRÉCIPITÉ ARGENTIQUE. — Le culot argentique est dissous dans 1 cm³ d'ammoniaque : en s'aidant d'un agitateur, cette dissolution se fait très facilement ; dans le cas d'une minéralisation par calcination on observe quelques flocons de magnésie. On ajoute 10 cm³ d'alcool, on précipite à nouveau en acidifiant par 2 à 3 cm³ d'acide acétique-acétate d'argent que l'on ajoute par 2 ou 3 gouttes à la fois. On lave l'agitateur et le bord supérieur du tube à l'aide de 2 cm³ d'alcool et on centrifuge. On décante et lave le tube comme ci-dessus. — On recommence une deuxième fois la dissolution dans l'ammoniaque et précipitation par acidification. On achève la purification du précipité en le mettant en suspension dans 10 cm³ d'eau distillée, en s'aidant d'un agitateur ; on centrifuge, décante et lave le tube comme ci-dessus. On fait ce lavage deux fois.

3° RÉDUCTION DU PRÉCIPITÉ ARGENTIQUE. — Le culot argentique est additionné de 1 cm³ de la solution saturée de NaCl diluée au quart. On porte au bain-marie. Après 30 à 40 secondes, on ajoute une aiguille de zinc de 2 à 3 cm. Le précipité argentique noircit d'abord au contact du zinc, puis la tache noire s'étend rapidement à toute la masse ; après une à deux minutes, on retire du bain-marie et refroidit dans un courant d'eau froide. On retire l'aiguille de zinc, en la saisissant à l'aide d'une pince par la partie qui émerge au dessus du liquide et on ajoute 1,5 cm³ de la solution tampon-colorant. On agite et centrifuge pour coller le précipité d'argent.

4° DOSAGE COLORIMÉTRIQUE. — Dans un petit tube de 12/60, on mesure 1 cm³ du liquide précédent ; on y fait tomber une goutte de la solution de chloramine N/20 et après 30 secondes, on arrête la réaction par

une goutte de solution décinormale d'hyposulfite. On ramène au pH 5,0 en ajoutant 0,5 cm³ de la solution normale de soude. Il ne reste plus qu'à comparer la teinte obtenue à celles de la gamme, ou mieux observer la coloration au photomètre de PULFRICH à l'écran S 57, sous une épaisseur de 5 cm. si l'on dispose de microcuves.

Justification de cette technique.

1° CALCINATION EN PRÉSENCE DE MAGNÉSIE. — La destruction de la matière organique par le carbonate de sodium et le nitrate de potassium nécessite l'emploi de capsules en argent, ce qui oblige, si l'on veut faire des dosages en série, à avoir de nombreuses capsules dont le prix est assez élevé ; d'autre part, la neutralisation ultérieure par l'acide nitrique est assez délicate, par suite du départ du gaz carbonique ; nous avons pensé remédier à ces inconvénients en remplaçant le mélange de carbonate de sodium et de nitrate de potassium, par de la magnésie et du nitrate de magnésium. Le nitrate de magnésium étant très hygroscopique, nous en avons fait une solution concentrée telle que 1 cm³ contienne 0,50 g. de nitrate. Le mélange de magnésie, nitrate de magnésium et du produit biologique était desséché, puis calciné au four à moufle ; mais nous avons constaté que le nitrate de magnésium amenait des pertes de brome, même à la température de 400° et quelles que soient les proportions de nitrate ; c'est pourquoi nous avons été amené à opérer en présence de magnésie seule, ce qui donne une combustion régulière et par ce procédé nous avons toujours retrouvé intégralement le brome ajouté.

La neutralisation de la magnésie par l'acide nitri-

que se fait sans aucun départ gazeux ; on remarque seulement un échauffement très notable du liquide. Or nous avons été amené à constater que dans ces conditions, il y avait des pertes assez considérables de brome, c'est pourquoi nous opérons cette neutralisation après addition de nitrate d'argent.

Enfin, pour éviter la précipitation de l'oxyde d'argent dans le milieu alcalin, nous ajoutons de l'ammoniaque, ce qui maintient en solution les ions Ag ; Ainsi, lors de l'acidification, le précipité d'halogénure se forme plus régulièrement et permet un meilleur entraînement du brome dans le précipité. (Rappelons que c'est par ce procédé d'addition d'ammoniaque, que nous avons réussi, dans nos essais de modifications de la méthode de LEIPERT et WATZLAWEK, à entraîner totalement le brome par une petite quantité de nitrate d'argent, en présence d'un grand excès de chlorure par rapport à l'argent ajouté).

1 BIS : MINÉRALISATION EN MILIEU HUMIDE. — Nous avons essayé d'obtenir une destruction de la matière organique en milieu liquide, ce qui éviterait l'emploi du four à moufle et permettrait plus facilement les dosages en série. L'idée primitive fut d'adopter la technique de LAUDAT [45] pour le dosage des chlorures dans le sang, dont le principe est le suivant : Attaque de la matière organique par l'acide nitrique et le permanganate de potassium en présence de nitrate d'argent. On obtient ainsi un précipité d'halogénures d'argent, que l'on pourrait traiter ensuite comme dans l'autre méthode, si tout le brome se trouvait dans le précipité. Or nous nous sommes aperçu que nous avions des pertes de brome, que l'expérience nous montra dues à la présence du permanganate. Nous avons donc été obligé de supprimer le

permanganate. Pour obtenir une destruction satisfaisante de la matière organique dans ces conditions, nous avons été obligé d'augmenter la concentration en acide et d'autre part de faire précéder cette attaque acide par une digestion alcaline.

2° PURIFICATION DU PRÉCIPITÉ ARGENTIQUE. — Le précipité argentique provenant de la destruction en milieu liquide retient des impuretés, vraisemblablement quelques matières organiques, incomplètement détruites ; le précipité argentique provenant de la minéralisation alcaline, formé dans le liquide relativement concentré de nitrates, est souillé par ces ions. Il faut procéder à une purification de ces précipités. Nous avons pensé que le meilleur moyen d'arriver à ce résultat était de solubiliser les halogénures d'argent par l'ammoniaque et de les précipiter ensuite en acidifiant le milieu. De cette façon il n'y a pas à craindre de laver le précipité seulement en surface. Il faut d'autre part éliminer complètement les ions nitriques. En effet cet acide nitrique, au cours de la réduction de l'argent, va donner des produits de réduction qui gênent la réaction colorimétrique. Nous avons en effet constaté que les ions nitrates ne gênent pas la réaction colorimétrique. Mais les nitrites empêchent complètement le développement de la matière colorante. Or, le précipité argentique contenant des traces d'acide nitrique donne après réduction de l'argent un liquide. 1° Qui gêne la réaction colorimétrique 2° qui déplace l'iode des iodures en milieu acide, 3° qui consomme du permanganate en milieu acide. Il est donc vraisemblable qu'après réduction nous avons des nitrites en solution. Pour éviter cet inconvénient nous avons donc été obligé de laver le précipité argentique sans employer l'acide nitrique.

3° RÉDUCTION DU PRÉCIPITÉ ARGENTIQUE (1). — Nous avons d'abord eu l'intention de réduire l'argent par le zinc en milieu sulfurique. Ce procédé, employé par A. DAMIENS, donne d'excellents résultats ; mais, dans notre technique, nous sommes obligé d'amener ensuite à un pH rigoureux. Pour cette raison, cette réduction présentait un inconvénient : en effet, l'acide sulfurique attaque le zinc et l'on obtient finalement une solution assez riche en sels de zinc ; si l'on veut neutraliser en présence d'un indicateur, pour ramener à pH 4,0, il se forme un précipité d'oxyde de zinc, qui gêne l'appréciation du virage.

Nous avons essayé de faire la réduction à pH 4,0, en mettant directement sur le précipité argentique la solution tampon et une aiguille de zinc : la réduction se conduit très normalement ; mais le zinc est attaqué par l'acide acétique et par suite le pH de la solution varie.

Nous avons alors pensé faire la réduction dans la solution ammoniacale d'halogénures d'argent. Nous avons essayé, avec des résultats plus ou moins décevants : le zinc, l'aluminium, le magnésium, l'eau oxygénée, l'hydrazine, et également l'élimination par l'hydrogène sulfuré. Tous ces produits nous donnaient des liquides gênant la formation de la matière colorante, soit par suite d'une réduction incomplète, soit par suite d'une mauvaise élimination ultérieure des réactifs en excès. Nous nous sommes attardé plus longuement sur la réduction par l'aldéhyde formique en présence de soude. Nous avons en

(1) En ce qui concerne l'action de la lumière sur les précipités argentiques, nous avons seulement pris la précaution de travailler la fenêtre fermée, de façon qu'une grande partie des rayons nuisibles soient arrêtés par les vitres, et d'éviter en plus l'action directe des rayons solaires. Dans ces conditions, étant donné la rapidité de la méthode, nous n'avons jamais observé de noircissement susceptible de gêner la suite des opérations.

effet réussi à mettre au point la réduction suivante : le précipité d'halogénure d'argent est dissout dans 1 cm³ d'ammoniaque ; on ajoute 0,5 cm³ de solution normale de soude et 1 goutte d'une solution à 15 ou 20 p. 100 d'aldéhyde formique. On porte au bain-marie ; il se produit une vive effervescence et en moins d'une minute la réaction est complète ; on laisse une demi-heure pour permettre l'élimination totale de l'ammoniaque ; on a finalement une solution alcaline de chlorure et bromure de sodium contenant un peu de formol en excès et de petites quantités de formiate qui ne gênent pas. Il suffit ensuite de neutraliser par une solution normale d'acide chlorhydrique ajouté goutte à goutte, à une goutte près, en prenant comme indicateur, la solution de phénolsulfonephtaléine elle-même. La solution acéto-acétique ajoutée ensuite est suffisamment tamponnée pour qu'une goutte d'acide en excès ne modifie pas sensiblement le pH.

Nous avons également obtenu des résultats intéressants en réduisant à froid le précipité argentique par l'aldéhyde formique en présence de soude, mais sans ammoniaque.

Cette réduction a ensuite été remplacée par la suivante qui est beaucoup plus simple : Nous avons en effet constaté qu'il était possible de réduire le précipité argentique par le zinc, simplement en présence d'une solution assez concentrée de chlorure de sodium à chaud (1). Nous avons d'abord employé la solution saturée de chlorure de sodium ; nous avons ensuite employé cette même solution diluée au quart de façon à avoir dans notre tube une quantité moindre de chlorure de sodium, d'où apport moins grand de brome possible par ce sel et d'autre part pour

(1) La réduction s'opère également dans l'eau seule, mais elle est plus lente.

éviter l'inconvénient possible de l'influence de solutions concentrées sur les matières colorantes. Nous employons pour cette réduction des aiguilles de zinc de 2 à 3 cm. de longueur, de telle sorte qu'une extrémité se trouve au dessus de la surface du liquide ; ainsi on peut saisir l'aiguille à l'aide d'une pince, sans être obligé de plonger cette dernière dans le liquide. Le zinc enlevé ne peut donc être attaqué par l'acide du tampon ; on a donc une solution au pH désiré sans aucune neutralisation.

L'addition de chlorure de sodium, en quantité suffisante, est nécessaire également pour une autre raison que voici : Nous avons constaté que la réaction colorimétrique était empêchée par des traces infimes d'argent : une quantité d'argent inférieure à celle correspondant à la limite de précipitation du chlorure d'argent (dont le coefficient de solubilité est de l'ordre de 10^{-5} molécules par litre) arrête complètement le développement de la coloration ; or l'addition de chlorure de sodium en quantité suffisante annihile complètement cette action néfaste des ions argentiques. La réaction colorimétrique étant si sensible aux ions argentiques, nous avons cru prudent d'ajouter dans notre milieu une certaine quantité de chlorure de sodium, car il est possible que, après réduction, il reste des traces infimes de chlorure d'argent non réduit, traces néanmoins suffisantes pour amener des perturbations dans le développement de la réaction ; et même en admettant la réduction complète du chlorure d'argent, la faible solubilisation de l'argent, qui peut atteindre dans l'eau 37 mg. par litre (qui est comme on sait suffisante pour manifester les propriétés bactéricides de ces ions) pourrait amener une légère perturbation.

Nous nous sommes arrangé pour avoir un volume final de 2,5 cm³. De cette façon, il est possible de faire deux prises de 1 cm³ et par suite de faire deux dosages colorimétriques sur le liquide final. La deuxième prise peut également servir à faire des dilutions, si la quantité de brome à doser est trop forte. Dans ce dernier cas, à 1 cm³ du liquide on ajoute 2 cm³ du mélange suivant (calculé de façon à avoir toujours la même concentration en mélange tampon, en colorant et en NaCl) :

Solution tampon	50	cm ³
Solution de rouge de phénol.....	0,5	cm ³
Solution saturée de NaCl, diluée au quart..	40	cm ³
Eau distilléeQ. S. P.	100	cm ³

Si la coloration est encore trop intense, on dilue cette dernière dilution, à nouveau au tiers et on fera un nouveau dosage colorimétrique sur la nouvelle dilution.

Technique pour le dosage dans les tissus.

A) MINÉRALISATION EN MILIEU HUMIDE. — Dans le tube de centrifugeur, on met 0,25 g. de tissu, 1 cm³ d'eau et 0,5 cm³ de lessive de soude ; on fait digérer au B. M. pendant 10 à 20 minutes suivant les tissus et on continue comme pour le sang.

B) CALCINATION EN PRÉSENCE DE MAGNÉSIE. — Il y a lieu de faire précéder la calcination d'une digestion alcaline. Dans un tube, on met 0,25 g. de tissu, 1 cm³ d'eau et 0,5 cm³ de lessive de soude. On fait digérer comme ci-dessus ; puis on transvase dans la capsule en s'aidant de quelques cm³ d'eau ; on ajoute 1,5 cm³ environ de solution saturée de sulfate de magnésium et 0,40 g. de magnésie, en évitant de laisser le liquide monter le long des parois ; on dessèche à l'étuve à 100° et on continue ensuite comme pour le sang.

Résultats obtenus avec ces techniques.

Le dosage colorimétrique seul, en présence de la quantité de NaCl, nous a donné :

Brome en γ	Coefficient d'extinction sous 50 mm. et à l'écran S 57
0	0,165-0,17
0,2	0,27 -0,26
0,4	0,40 -0,39

En faisant un dosage témoin total (c'est à dire en faisant toute la technique, mais en remplaçant le sang ou les tissus par 0,25 cm³ de solution décinormale de HCl) nous avons obtenu les chiffres suivants:

Brome ajouté au début en γ	Brome dosé en γ	Coefficient d'extinction sous 50 mm. et à l'écran S 57.
0	0	0,17-0,18
0,5	0,2	0,29-0,30
1	0,4	0,42-0,42

Enfin, nous avons fait le dosage sur un sang total, auquel nous avons ajouté des quantités déterminées de brome, sous forme de bromure. Voici les résultats obtenus :

Brome ajouté au début en γ	Brome dosé en γ	Coefficient d'extinction sous 50 mm. et à l'écran S 57	
		Voie sèche	Voie humide
0	0	0,29-0,31	0,29-0,30
0,5	0,2	0,43-0,41	0,39-0,40
1	0,4	0,53-0,52	0,50-0,48
0,5 ajouté avant la réduction argentique	0,2	0,42-0,43	0,40-0,41

D'après ces résultats, on voit que la technique par voie sèche nous donne des résultats meilleurs. Dans la méthode par voie humide nous n'obtenons pas un développement complet de la matière colorante, vraisemblablement par suite de la présence de traces d'impuretés qui n'ont pu être enlevées par les lavages. Néanmoins, nous croyons que dans certains cas cette technique est utilisable et peut rendre des services, car elle donne des résultats suffisamment constants et d'autre part, elle permet plus facilement le travail en série que la technique par voie sèche.

Influence des iodures. — Nous avons pris un sang auquel nous avons ajouté des quantités déterminées d'iode sous forme de KI.

Iode ajouté en γ	Coefficient d'extinction sous 50 mm. et à l'écran S 57	
	Voie sèche	Voie humide
0	0,28-0,26	0,26-0,27
50	0,34-0,34	0,33-0,32
100	0,37-0,39	0,38-0,38

On voit que des quantités relativement énormes d'iode, correspondant respectivement à 0,20 g. et 0,40 g. d'iode par litre de sang, n'amène que des perturbations minimales dans le dosage des bromures.

Ainsi ces deux techniques semblent répondre au but que nous nous étions proposé au début de ce travail : elles sont en effet *rapides* : pour faire 8 dosages, nous mettons moins de 3 heures, avec l'une ou l'autre destruction. Elles sont *simples* : elle ne nécessitent aucun appareil particulier. Elles sont très *sensibles*,

puisqu'elles nous ont permis d'opérer sur 25 cg. de produit biologique seulement, alors que la plupart des méthodes existantes nécessitent un minimum de 5 g. de substance. Enfin, elles sont, croyons-nous, *suffisamment exactes*, pour les problèmes biologiques : on peut admettre une erreur inférieure à 20 p. cent, lorsque les quantités de brome à doser dans la prise d'essai sont de l'ordre de 0,1 à 0,2 γ. Cette erreur peut être diminuée si l'on fait plusieurs dosages sur le même échantillon, ce qui est facile étant donné la petitesse de la prise d'essai.

TROISIÈME PARTIE.

APPLICATIONS.

La technique sensible que nous avons mise au point va nous permettre de faire des dosages du brome dans un certain nombre de produits biologiques.

SANG.

Nous avons dosé le brome dans un certain nombre de sérums anguins, de sang totaux et de globules, provenant de malades de l'Hôpital psychiatrique de Villejuif. Etant donné la grande sensibilité de notre technique qui ne nécessite qu'une prise d'essai de 0,25 cm³, il est possible de faire plusieurs dosages, même avec un prélèvement minime de sang, ce qui permet, en faisant la moyenne de plusieurs dosages, de réduire l'erreur. Les résultats que nous donnons ci-dessous sont la moyenne de deux dosages. Ces résultats sont exprimés en γ par cm³, ou ce qui revient au même, en milligramme par litre.

Sang total.

	Résultats en mg. par litre	Moyenne en mg. par litre
Fel.....	2,5-2,7	2,6
Gra.....	1,6-1,7	1,7
Lie.....	2,2-2,2	2,2
Haa.....	2,3-2,6	2,5
Boi.....	3,0-3,0	3,0
Ped.....	3,8-4,2	4,0
Amb.....	2,4-2,4	2,4
Mar.....	1,7-1,5	1,6
Rou.....	1,4-1,7	1,6
Bra.....	7,3-7,3	7,3
Lep.....	6,2-6,3	6,3
Ber.....	1,8-2,0	1,9
Fon.....	2,3-2,2	2,2
Fie.....	2,2-2,5	2,4
Pel.....	8,8-9,0	8,9
Bel.....	2,6-2,6	2,6
Gru.....	2,0-2,1	2,1
Cen.....	2,7-3,0	2,9
Dave.....	1,7-1,9	1,8
Gue.....	1,3-1,4	1,4
Guy.....	2,4-3,1	2,8
Vin.....	2,1-2,3	2,2
Bar.....	1,4-1,4	1,4
Deb.....	1,1-1,1	1,1
Deh.....	0,9-1,3	1,1
Mel.....	1,2-1,3	1,3

Sérum sanguin.

	Résultats en mg. par litre	Moyenne en mg. par litre
Gra.....	1,2-1,3	1,3
Haa.....	2,2-2,2	2,2
Boi.....	2,3-2,4	2,4
Pern.....	2,5-2,8	2,7
Mar.....	1,2-1,2	1,2
Rou.....	0,9-0,9	0,9
Pere.....	2,5-2,5	2,5
Lep.....	6,5-6,4	6,5
Ber.....	1,7-1,7	1,7
Davi.....	1,4-1,5	1,5
Dev.....	1,3-1,2	1,3
Cha.....	1,4-1,3	1,4
Baz.....	1,2-1,2	1,2
Bla.....	1,1-1,4	1,3
Sim.....	1,0-1,1	1,1
Lan.....	1,3-1,5	1,4
Urs.....	1,7-1,7	1,7
Oll.....	2,5-2,8	2,7
Res.....	2,0-2,0	2,0

Globules sanguins.

	Résultats en mg. par litre	Moyenne en mg. par litre
Gri.....	1,5-1,7	1,6
Fal.....	2,1-2,4	2,3
Rus.....	1,1-1,4	1,3
Mir.....	1,4-1,5	1,5

Nous donnons ces quelques chiffres, simplement pour montrer les quelques résultats que nous avons obtenus avec notre technique. Certains de ces chiffres n'ont qu'une valeur indicative, car ils ont été obtenus avec une technique incomplètement mise au point. Néanmoins, à part quelques chiffres trop élevés, que l'on peut supposer provenir de malades ayant ingéré des bromures, nous trouvons des teneurs en brome du même ordre de grandeur que Mlle C. CHATAGNON, qui, avec la méthode de A. DAMIENS, a obtenu des teneurs variant de 0,20 mg. à 4 mg. par litre de sang total frais.

Conservation. — Nous avons examiné si au cours de la conservation du sang le taux du brome variait : nous avons préparé deux échantillons de sérum, un de provenance humaine et l'autre de provenance chevaline (Hémostyl) : chaque échantillon a été divisé en deux parties, dont l'une était conservée à la glacière, l'autre était maintenue à la température du laboratoire. Nous avons suivi ces deux sérums pendant deux mois, au cours desquels nous n'avons observé aucune disparition notable de brome, quoique les sérums conservés au laboratoire, présentassent à la fin de l'expérience une forte odeur indiquant une fermentation très avancée. Voici quelques chiffres obtenus au cours de cette expérience, exprimés en mg. de brome par litre de sérum.

<i>Sérum humain</i>		<i>Sérum de cheval</i>	
Conservation :		Conservation :	
à la glacière	au laboratoire	à la glacière	au laboratoire
1,3	1,4	3,9	4,0
1,4	1,2	4,1	3,7
1,5	1,4	4,2	3,9
1,3	1,2	4,0	4,4
1,3	1,3	4,1	4,2

Dosage du brome chez de petits animaux de laboratoire.

La sensibilité de notre technique va nous permettre de doser le brome dans les organes de petits animaux. Nous donnerons à titre d'exemple quelques résultats obtenus sur des organes de souris.

Organes	Souris I Poids 22 g.		Souris II Poids 28 g.	
	Poids du prélève- ment en g.	Brome en mg. par kg.	Poids du prélève- ment en g.	Brome en mg. par kg.
Poumons.....	0,22	4,8	0,25	4,0
Cœur.....	0,16	3,1	0,19	3,3
Reins.....	0,18	2,5	0,24	4,4
	0,19	2,6	0,25	5,2
Foie.....	0,25	4,0	0,25	1,0
	0,25	4,4	0,25	1,5

CONCLUSIONS.

Ayant été amené à nous occuper du problème du brome en biologie, nous avons essayé de mettre au point une méthode à la fois simple, rapide, sensible et suffisamment exacte. Pour arriver à ce résultat, nous avons examiné différentes méthodes déjà proposées. Nous avons étudié d'une part le problème du dosage du brome minéralisé dans le cas de faibles quantités de brome en présence de grandes quantités de chlorure, d'autre part le problème de la minéralisation.

Parmi les méthodes de dosage du brome minéralisé, nos recherches ont porté spécialement sur les dosages colorimétriques.

Les méthodes colorimétriques employant la fuchsine comme réactif ont tout d'abord retenu notre attention. Malgré quelques essais de sensibilisation ou d'adaptation, nous n'avons pu les retenir, à cause de leur sensibilité insuffisante pour le problème que nous nous étions posé.

Les méthodes à la fluorescéine étudiées ensuite ont à leur tour été abandonnées pour les méthodes à la phénolsulfonephtaléine qui nous ont donné des résultats plus intéressants. Nous avons ainsi mis au point une technique colorimétrique sensible, basée sur la formation de tétrabromophénolsulfonephtaléine. Cette technique nous a permis de doser jusqu'à 0,1 γ

de brome avec une approximation suffisante pour le but poursuivi.

Parmi les méthodes employées pour la minéralisation des produits biologiques en vue du dosage du brome, nous avons étudié un procédé par voie humide, la méthode de Th. LEIPERT et O. WATZLAWEK. Elle est basée sur le principe de la destruction sulfochromique en présence de sulfate d'argent, entraînement du brome libéré par un courant d'air dans de la soude et titration du brome par transformation en bromate ; ce bromate agissant sur l'iodure de potassium libère de l'iode que l'on titre par l'hyposulfite. La purification des réactifs a été pour nous un problème difficile ; nous avons cependant pu contrôler l'exactitude de cette méthode, à laquelle nous avons essayé de faire subir quelques modifications. Mais nous ne l'avons utilisé que pour vérifier les résultats que nous avons obtenus avec la technique que nous avons ensuite mise au point.

Nous avons pris comme type des méthodes par voie sèche, la méthode de A. DAMIENS. C'est en partant de cette méthode que nous avons pu mettre au point la technique personnelle répondant aux conditions que nous nous étions imposées au début de ce travail.

Dans une dernière partie, nous avons montré les applications possibles de cette technique sensible dans le domaine biologique.

Vu, Bon à imprimer :
Le Président du Jury,
A. DAMIENS.

Vu :
Le Doyen de la Faculté,
A. DAMIENS.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
G. ROUSSY.

BIBLIOGRAPHIE ⁽¹⁾.

BALARD (1)

Sur une substance particulière contenue dans l'eau de la mer. *Ann. Chim. Phys.*, 1826, (2°), **32**, 337.

D'après *Les classiques de la découverte scientifique : Halogènes et composés oxygénés du chlore*. Gauthier-Villars, éditeurs, Paris 1938.

BALDI (27)

Arch. ital. de Biol., 1889, 29, d'après A. DAMIENS.

BAUBIGNY (H.) (26)

Emploi de la fluorescéine pour la recherche de traces de traces de brome dans un mélange salin. *C. R.*, 1897, **125**, 654.

BLAIGNAN (Mlle S.) (44)

Contribution à l'étude du brome normal dans le règne végétal. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1932.

BRARD (D.) (41)

Contribution à l'étude toxicologique du chrome. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris 1934.

CHATAGNON (Mlle C.) (20 bis, 43)

L'élimination du brome dans l'organisme humain. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris 1937.

DAMIENS (A.) (3, 12, 20, 34, 42)

Sur le brome existant normalement dans les tissus animaux. *Bull. Sc. Pharm.*, 1920, **27**, 609 ; 1921, **28**, 37, 85 et 205.

DENIGÈS (G.) (17)

Sur la recherche du brome à l'aide du réactif de SCHIFF. *Bull. des travaux de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 1912, **52**, 465.

(1) Nous avons suivi l'ordre alphabétique des auteurs. Les chiffres entre parenthèses correspondent au numéro de la citation dans le texte, d'après l'ordre où les auteurs sont cités.

DENIGÈS (G.) et CHELLE (L.) (11,18)

Nouveau réactif du chlore et du brome libre et combiné. Dosage extemporané du brome dans les eaux naturelles, etc. *Bull. des travaux de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 1912, **52**, 470.

DENIGÈS (G.) et CHELLE (L.) (19)

Modification à la technique de la recherche et du dosage du brome ionisé par le réactif fuchsine sulfurique. *Bull. des travaux de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 1917, **55**, 75.

DIAS (A.) (4 bis)

Sur le dosage microchimique du brome dans le sang selon la méthode de PINCUSSEN et ROMAN. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1115.

FREZOULS (J.) (15, 23)

Nouvelle technique pour la recherche et le dosage du brome par le réactif de DENIGÈS-CHELLE. *Ann. Fals. et Fraudes*, 1934, **307**, 351.

GILDE (S.) (5)

Le dosage de traces de brome en présence de chlore. *Ann. de Chim.*, 1935, (11°), **4**, 224.

GUARESCHI (16)

Nuova reazione del bromo sensibilissima anche in presenza degli altri alogeni. Communiqué le 28 avril 1912, à l'Académie des Sciences de Turin. D'après DENIGÈS.

GUILLAUMIN (Ch.-O.) et MEREJKOWSKY (B.) (6, 13, 21, 35)

Sur le dosage du brome normal dans le sang et les sérosités, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, **17**, 485.

HAHN (F. L.) (31)

Sur le dosage de traces de brome en présence d'un grand excès de chlore. *C. R.*, 1935, **197**, 245.

LABAT (A.) (2, 30)

Modification de la réaction de BAUBIGNY pour la recherche du brome libre. *Bull. des travaux de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 1912, **52**, 158.

LABAT (A.) (2, 30)

Caractérisation du brome libre en présence d'iode et de chlore par la réaction de BAUBIGNY. Même bulletin, 1912, **52**, 212.

LABAT (A.) (2, 30)

Sur la caractérisation du brome et de l'iode simultanément libérés en milieux aqueux. Même bulletin, 1912, **52**, 219.

LABAT (A.) (2, 30)

Introduction à l'étude de la présence du brome dans les organes de l'Homme. Thèse de Médecine de Bordeaux, n° 147, 1912.

LABAT (A.) (2, 30)

Sur la présence de brome à l'état normal dans les organes de l'Homme. *C. R.* 1913, **156**, 255.

LAUDAT (M.) (45)

Le dosage du chlore dans le sérum sanguin et dans les liquides albumineux de l'organisme. *Journ. Pharm. Chim.*, 1917, **16**, 168.

LEIPERT (Th.) (37)

Das brom. Seine Biochimie und mikroanalytische Bestimmung. *Mikrochimica Acta*, 1938, **3**, 147.

LEIPERT (Th.) et WATZLAWEK (O.) (9, 38)

Le dosage de très petites quantités de brome dans les liquides biologiques *Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol. Chem.*, 1934, **226**, 108.

OLSZYCKA (Mlle L.) (7, 14, 22, 24, 36)

Sur le dosage du brome dans les substances biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, **17**, 852.

PADERI (28)

Bull. Soc. méd. chir., Pavia, 1938, d'après A. DAMIENS.

PRIBRAM (29)

Z. physiologische Ch., 1906, **49**, 457, d'après A. DAMIENS.

SCHEUING (G.) et SCHAAFF (O.) (10)

Ber. d. chem. Gesells., 1923, **56**, 1588, d'après RUMPF (P.) : recherches physico-chimiques sur la réaction colorée des aldéhydes, dite « réaction de Schiff » ; *Ann. de Chim.*, 1935, (11°), **3**, 327.

STENGER (V. A.) et KOLTHOFF (I. M.) (32)

Recherche et dosage colorimétriques de petites quantités de brome. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1935, **57**, 831.

SWARTS (25)

Bull. Acad. Belgique, 1889, **17**, 359, d'après GUILLAUMIN (Ch.-O.) et MEREJKOWSKI (B.),

TIFFENEAU (M.) (33)

Influence des diverses conditions expérimentales sur la production de l'anesthésie par les bromures d'éthyle et de propyle et sur la répartition de ces substances dans l'encéphale. *Bruxelles-Médical*, 1938, **18**, 1529.

VAN DER MEULEN (J. H.) (8, 40)

Recherches bromo-iodométriques. *Chem. Weekblad.*, 1931, **28**, 82.

WESZELSZKY (I. V.) (39)

Zeits. Anal. Chem., 1900, **39**, 81. D'après LEIPERT Th. et WATZLAWEK O.

ZONDEK (H.) et BIER (A.) (4)

Brom im Blute bei manisch-depressiven Irresein. *Biochem. Z.*, 1931, **241**, 491.

ZONDEK (H.) et BIER (A.) (4)

Klin. Wchschr., 1932, **11**, 633, 759, 760 — 1933, **12**, 55, 1411. D'après LEIPERT Th.

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
INTRODUCTION	7
PREMIÈRE PARTIE.	
Dosage du brome minéralisé	13
CHAPITRE I. — Méthodes à la fuchsine.....	18
Méthode primitive de G. DENIGÈS.....	20
Méthode de G. DENIGÈS et L. CHELLE.....	21
Modification de G. DENIGÈS et L. CHELLE.....	24
Technique de A. DAMIENS.....	25
Technique de Ch.-O. GUILLAUMIN et B. MEREJKOWSKI.....	27
Technique de Mlle L. OLSZICKA.....	28
Méthode de J. FREZOULS.....	29
Comparaison de ces différentes méthodes.....	34
Essai de modification de la méthode.....	37
Essai de sensibilisation	37
Essai des adsorbants	38
Essai de la fuchsine acide.....	39
CHAPITRE II. — Méthodes à la fluorescéine.....	41
Méthode de A. LABAT.....	42
Méthode de F. L. HAHN.....	44
Vérification de la méthode de F. L. HAHN.....	45
Essai de sensibilisation de la méthode.....	45
Pureté des fluorescéines commerciales.....	48
Résultats obtenus avec la technique modifiée..	50
CHAPITRE III. — Méthodes à la phénolsulfonephtaléine....	54
Méthode de V. A. STENGER et I. M. KOLTHOFF.....	55
Première technique proposée	57
Etude systématique de la réaction colorimétrique..	59
Deuxième technique	64
Technique plus sensible	65

DEUXIÈME PARTIE.

Minéralisation	69
CHAPITRE I. — Méthode de T. H. Leipert et O. Watzla- weck	71
Appareil	72
Réactifs	75
Technique	76
Vérification de la méthode.....	78
Critique de la méthode.....	81
Essais de modification de la méthode.....	83
CHAPITRE II. — Méthode de A. Damiens	88
CHAPITRE III. — Technique personnelle	92
Principe	92
Réactifs	92
Appareils	94
Technique pour le dosage dans le sang.....	94
Justification de cette technique.....	97
Technique pour le dosage dans les tissus.....	103
Résultats obtenus avec ces techniques	104

TROISIÈME PARTIE.

Applications	107
CONCLUSIONS	111
BIBLIOGRAPHIE	113
TABLE DES MATIÈRES	117

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER.

